UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-1962 N° 815

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES LIPASES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Isolement et purification

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 28 novembre 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

PETER VILLIGER
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MEYER, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550011_0008

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-1962 No 815

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES LIPASES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Isolement et purification

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 28 novembre 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

PETER VILLIGER
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MEYER, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION :

MM. DUQUÉNOIS, *Doyen*, ✻, I. ⟨⟩, ⛃
GAZET DU CHATELIER, *Assesseur*, I. ⟨⟩
CLADY, *Secrétaire*, I. ⟨⟩

PROFESSEURS :

MM.	LAPP, ✻, I. ⟨⟩	Physique
	SARTORY, O. ✻, I. ⟨⟩, O. ⛃	Bactériologie
	CORDIER, ✻, I. ⟨⟩	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS, ✻, I. ⟨⟩, ⛃	Matière médicale
	JAEGER, I. ⟨⟩, ⛃	Botanique
	GAZET DU CHATELIER, I. ⟨⟩	Pharmacie galénique
	HASSELMANN, I. ⟨⟩	Chimie analytique
	SCHREIBER, I. ⟨⟩	Chimie organique
	EBEL, ✻, ⛃ I. ⟨⟩	Chimie biologique

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	LEDOUX, ⛃, ⟨⟩	Sciences naturelles
	MÉTAIS	Sciences appliquées
	MALGRAS	Sciences naturelles
	LAUSTRIAT	Sciences physico-chimiques

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE :
M. COLLARD

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	LAPP	Acoustique
	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Éléments de chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Chimie minérale
	SCHREIBER	Chimie générale
	EBEL	Biochimie analyt. et séméiolog.
	LAVIGNE	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	LEDOUX	Bactériologie pharm. et techn.
	MALGRAS	Sérologie
	LAUSTRIAT	Minéralogie et Éléments de mathématiques
	C. MEYER	Comptabilité et fiscalité pharmaceutiques

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

Mme	KRISTENSEN		Chimie pharmaceutique
MM.	MATHIS	(chargés des fonctions)	Chimie
	CARBIENER		Histoire naturelle
	STAHL		Bactériologie et Parasitologie
	C. F. LAPP		Chimie et Physique
	ROMOND		Bactériologie

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur P. CORDIER

Professeur de Pharmacie Chimique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MEYER

Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A mes Parents,

A ma Femme,

A tous ceux qui me sont chers.

INTRODUCTION

La question des lipases et des estérases microbiennes a déjà fait couler beaucoup d'encre. Le but de notre travail a été d'étudier *les systèmes enzymatiques permettant à Mycobacterium tuberculosis d'exercer son activité lipolytique et sa lipogenèse.*

Les problèmes ayant trait à l'isolement et à la purification des tuberculolipases sont très curieux et complexes; ce sont donc ces problèmes qui nous ont particulièrement intéressés, en nous basant sur les travaux antérieurs de l'école de R. SARTORY et J. MEYER.

Pour nous éviter des tâtonnements inutiles et la répétition de travaux déjà publiés à ce sujet, il était indispensable de procéder tout d'abord à une étude bibliographique fouillée; ces recherches constituent la première partie de notre travail.

Nos travaux personnels sont exposés dans la seconde partie. Nous résumons, dans les conclusions générales, les résultats théoriques et pratiques de ces expériences et les interprétations qu'on peut en tirer.

Étant donné la complexité des problèmes ainsi soulevés, nous n'avons pas la prétention d'apporter des solutions définitives; comme nous l'indiquons dans l'en-tête de ce travail, nous ne le considérons que comme *une contribution* à la connaissance des tuberculolipases.

Avant d'entrer dans le vif de notre sujet, qu'il nous soit permis de remercier ici Monsieur R. SARTORY, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, pour l'accueil aimable qu'il nous a réservé dans son laboratoire et pour l'honneur qu'il nous fait en présidant ce jury.

Nous remercions également Monsieur P. CORDIER, *Professeur de Pharmacie Chimique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, d'avoir bien voulu accepter de siéger dans ce jury.

Toute notre gratitude est acquise à Monsieur J. MEYER, *ancien Maître de conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg ;* après avoir été l'instigateur de ce travail, il nous a grandement aidé en mettant sa science et sa compétence à notre disposition, nous aidant de ses conseils chaque fois que cela était nécessaire.

Nous n'oublions pas non plus l'amabilité de Monsieur J. MALGRAS, *Maître de conférences de Sciences Naturelles à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, et de toutes les personnes qu'il nous a été donné de

rencontrer dans le *Service de Bactériologie*. Nous les assurons ici de notre amical souvenir.

Qu'il nous soit permis de donner une pensée reconnaissante à *Monsieur le Professeur* REISS, qui nous a initié aux recherches biochimiques dans le « *Biochemistry Department* » de la « *Colorado Foundation for Research in Tuberculosis* » *à Denver, Colorado, U.S.A.* Grâce à lui, nous avons eu accès à la bibliothèque « *Charles F. Denison Memorial Library* » de la Faculté de Médecine de l'Université du *Colorado à Denver*, où nous avons puisé des renseignements très précieux pour notre travail.

PLAN DE TRAVAIL

Les bases théoriques décrites dans *la première partie* ont orienté nos travaux personnels exposés dans *la deuxième partie.*

Nous cultivons la souche de *Bacille tuberculeux* 81.868 de la collection Hauduroy, Lausanne, et *une souche* nº 546 de B.C.G. *de l'Institut Pasteur* dans un milieu liquide qui doit nous permettre une récolte abondante. Les cultures sont effectuées à 37º pendant 10 à 15 jours et la masse bactérienne est séparée du milieu liquide par filtration sur ultra-filtre de *Seitz.* Nous recherchons, dans une suspension de bactéries acido-alcoolo-résistantes non dégraissées, la présence d'un système enzymatique actif sur divers substrats lipidiques.

Nous allons homogénéiser des suspensions bactériennes au moyen d'un broyeur électrique à billes, ceci pour obtenir éventuellement une diminution du pouvoir *acido-alcoolo-résistant* et faciliter l'extraction des *lipases endocellulaires.*

Nous allons ensuite délipoïder *nos bactéries* A.A.R. selon un procédé spécial. Nous travaillons avec des solvants organiques afin de pouvoir démontrer éventuellement l'existence de *lipases liposolubles.* Dans ce cas, nous procéderons à leur purification par dialyse et lyophilisation.

Les bactéries délipoïdées vont être employées dans de nombreuses expériences pour mettre en évidence et isoler éventuellement des *estérases et lipases oléo- et glycérinophiles.* Nous étudions l'effet adjuvant et protecteur des ions présents dans le substrat d'extraction.

Puis nous nous intéressons à l'extraction de *lipases hydrophiles,* et ceci grâce à l'emploi de tampons à pH et concentration moléculaire variant en rapport avec les protéines lipolytiques à extraire. *La purification des lipases isolées* est tentée par fractionnement dans des solutions alcooliques à degré d'éthanol divers, puis par dialyse et lyophilisation.

Nous envisageons ensuite la purification *des lipases isolées* au moyen de la chromatographie en colonne.

Nous employons finalement *les lipases purifiées* pour des expériences « *in vivo* », afin de mettre éventuellement en évidence leur pouvoir antilipasique.

Des *conclusions générales* terminent notre exposé.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

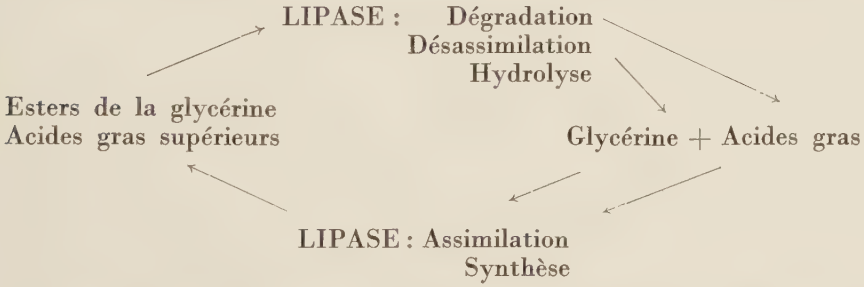
CHAPITRE I

BASES THÉORIQUES DE L'ÉTUDE DES LIPASES

Définition des tuberculolipases :

Jacobs (1), dans son « *Dictionary of Microbiology* », définit les lipases comme enzymes estérolytiques du groupe des hydrolases, scindant les graisses en acides gras et en glycérine. Thomas et Grainger (2) ont sélectionné parmi les bactéries les producteurs de lipases qui ont des « *propriétés glycérogènes* ». Un nombre assez restreint de *bactéries courantes* élaborent des enzymes lipolytiques et les deux auteurs séparent, parmi *les bactéries saprophytes*, un groupe spécial glycérogène.

Nous aurons l'occasion d'expliquer ultérieurement les principes de l'activité enzymatique réversible des lipases, mais, pour faciliter notre exposé, nous voudrions tout de suite donner le schéma suivant du pouvoir de dégradation et de synthèse de ces lipases [Zinsser (3)].



Comme définition provisoire, nous pouvons admettre : *Les tuberculolipases sont des enzymes qui catalysent le métabolisme des glycérides supérieurs lors des processus vitaux de Mycobacterium tuberculosis.*

Cette définition est valable pour les *lipases proprement dites*. La spécificité du substrat doit être nettement déterminée. Dans la littérature

spécialisée, *cette définition des lipases tuberculeuses* est prise dans un sens beaucoup plus large, et comprend à la fois les *lipases proprement dites et les estérases* [Carrière (4)]. D'après certains auteurs, tels que Kendall et ses collaborateurs (5), Wells et Corper (6), Long (7), ces enzymes ont fait l'objet d'études approfondies quant à leur relation avec *le taux lipidique élevé des bacilles acido-alcoolo-résistants.*

Les résultats de Wells et Corper ont montré une grande analogie de leur activité estérasique et lipasique vis-à-vis de triglycérides et de l'huile d'olive et l'on pouvait supposer qu'il s'agit là *d'une enzyme unique.*

Des travaux ultérieurs ont prouvé que l'on travaillait plutôt avec *des estérases* actives contre les esters des acides acétique et butyrique qu'avec des lipases proprement dites.

Au cours de travaux plus récents, Cohen et ses collaborateurs (8) ont étudié les estérases d'extraits ou de suspensions de *mycobactéries saprophytes* et de *Bacilles de Koch* des souches H 37 R*a*, H 37 R*v* et BCG. Comme substrat enzymatique, ces auteurs ont employé des esters du β-naphtol chromogène, de l'acide acétique (2 C), de l'acide propionique (3 C), de l'acide caprylique (8 C), de l'acide caprique (10 C), de l'acide laurique (12 C), de l'acide myristique (14 C) et de l'acide stéarique (18 C).

Ces auteurs ont ainsi pu déterminer que les enzymes agissent dans cette série d'esters homologues d'une façon analogue aux *ali-estérases.* Le bien-fondé de cette affirmation a été renforcé par l'emploi d'inhibiteurs d'enzymes spécifiques et *les estérases de mycobactéries* se comportaient vis-à-vis de ces inhibiteurs comme des ali-estérases.

Richter et Croft (9) ont décrit une estérase qui agit *sur des esters aliphatiques simples et des esters de la glycérine.* Nachlas et ses collaborateurs (10) ont également eu recours à des esters du β-naphtol et ces auteurs ont élargi *la définition des lipases :* d'après eux, *les lipases sont des enzymes hydrolysant non seulement des glycérides, mais des esters d'acides gras à longue chaîne en général, y compris les graisses et les huiles.*

Huggins et Lapides (11) ont employé l'ester du para-nitro-phénol pour déceler les lipases, alors que Ravin et Seligman (12) ont travaillé avec des esters d'indoxyles. Sierra (13) admet, au cours de ses expériences, la définition de Nachlas et Seligman pour toutes les lipases microbiennes, *à l'exception de la lipase de Mycobacterium phleï qui ne dégrade que les Tweens.* Mentionnons qu'il s'agit de :

Tween 80 = Mono-oléate du poly-oxy-éthylène-20-sorbitan;

Tween 60 = Mono-stéarate du poly-oxy-éthylène-20-sorbitan:

Tween 40 = Mono-palmitate du poly-oxy-éthylène-20-sorbitan:

Tween 20 = Mono-laurate du poly-oxy-éthylène-20-sorbitan.

Sierra a proposé l'emploi du Tween 80 comme substrat général pour la détermination de l'activité lipolytique de tous les micro-organismes.

Sa méthode est plus pratique que celles qui ont été données par Bulder (14) et Skerman (15). Davis et Dubos (16) ont également eu recours au Tween 80, qu'ils recommandent comme réactif très sensible dans la recherche des lipases. Archibald (17) a travaillé avec les Tweens au cours de ses recherches sur l'influence des concentrations de substrats. Gomori (18) a eu recours aux Tweens dans ses méthodes histochimiques.

Meyer et Malgras (19) ont différencié *les estérases des lipases proprement dites ;* ils ont, pour la première fois, caractérisé *une lipase microbienne* dans les cultures de bacilles acido-alcoolo-résistants et dans le sérum de tuberculeux. Cette lipase a été classée parmi les *phytolipases* puisqu'elle a été isolée au moyen de solvants lipidiques d'après la méthode de Bamann et Myrbæck (20). *Cependant, la classification des lipases en zoo- et phytolipases n'est plus justifiée d'après les travaux plus récents de* Bamann *et ses collaborateurs* (21).

Meyer et Malgras affirment avec raison que les substrats par excellence des tuberculolipases sont les *tuberculolipides homologues ou hétérologues.*

Sartory, Meyer et Lange (22) ont prouvé que *la diminution de l'acido-résistance* et les modifications structurales des bacilles tuberculeux sont dues à l'action de la lipase tuberculeuse. Sartory et Meyer (23) ont démontré qu'une lipase stable hydrolyse très rapidement les tuberculolipides; leur lipase a été isolée à partir de milieu de culture liquide glycériné de *Mycobacterium tuberculosis Vallée.* Cette lipase tuberculeuse attaquait moins rapidement l'huile d'olive et encore plus lentement le butyrate d'éthyle.

D'après Crowle (24) et Burrow (25) les *phosphatides* constituent un groupe important des tuberculolipides. Leur dégradation par action enzymatique est attribuée à une *phospholipase.* Enemoto (26) a pu prouver que le sérum et des tissus prélevés sur des cobayes immunisés par le bacille BCG ou sur des rats naturellement tuberculo-résistants, *possèdent une activité double ou même quadruple des phospholipases* par rapport au sérum et aux tissus provenant d'animaux réceptifs à la tuberculose.

Des *injections intrapéritonéales* de tuberculophosphatides, pratiquées par Gerstl et Tennant (27), ont occasionné des modifications immunologiques caractéristiques chez des lapins initialement normaux. Des animaux préalablement traités avec ces tuberculophosphatides présentaient des symptômes pathologiques beaucoup plus faibles. Les auteurs supposent, par conséquent, *que des animaux vaccinés sont capables d'inhiber ensuite les phosphatides par une activité enzymatique spécifique.*

Hoshishima et ses collaborateurs (28) ont pu isoler une tuberculophospholipase de *Mycobacterium tuberculosis aviaire.* Ils ont dosé l'activité enzymatique par rapport à la diminution de l'activité hémolytique de *la lysolécithine.*

Pour expliquer la spécificité relativement faible des tuberculolipases vis-à-vis des différents substrats, souvent mentionnée dans la littérature spécialisée, nous pouvons considérer trois motifs :

1° L'isolement des lipases a entraîné en même temps des estérases dans l'extrait enzymatique.

2° Les lipases possèdent une spécificité de substrat assez peu marquée; autrement dit, les tuberculolipases possèderaient un pouvoir d'adaptation assez prononcé vis-à-vis des substrats qui leur sont offerts.

3° Dans un système enzymatique lipolytique il existe différentes enzymes lipasiques, donc chacune a ses affinités propres vis-à-vis d'un substrat donné, sa concentration ionique et ses autres propriétés physiques individuelles.

Il est intéressant de noter à ce sujet que A. Sartory et J. Meyer ont pu mettre en évidence une activité décroissante dans leur extrait lipasique, *allant des tuberculolipides vers l'huile d'olive et finalement au butyrate d'éthyle.* On peut en conclure que dans leur préparation glycérinée se trouvait un système de *phospholipases* beaucoup plus homogène qui agissait principalement sur la dégradation des phospholipides.

Ayant ainsi donné un aperçu général sur la complexité de l'activité des tuberculolipases, nous nous proposons de donner un sens plus large à leur définition.

Les tuberculolipases sont des enzymes élaborées par *Mycobacterium tuberculosis* à titre de *biocatalyseurs du métabolisme tuberculolipidique.* Elles possèdent par conséquent une activité enzymatique réversible (dans le sens de synthèse et de dégradation) vis-à-vis de nombreux substrats lipidiques.

Nous nous expliquons par l'équation suivante :

$$L + S \rightleftharpoons (LS) \rightleftharpoons L + P$$

qui nous permet de constater :

1° Les tuberculolipases L réagissent avec les substrats S pour donner naissance à la combinaison intermédiaire lipase-substrat (LS = esters d'acides gras). Ce complexe se scinde en lipases L et en autres produits estérifiés P.

2° Les produits estérifiés P réagissent réversiblement avec la lipase L en passant par le produit intermédiaire (LS) pour former le substrat S avec libération de la lipase L.

3° La lipase L n'est pas modifiée par cette réaction, ce qui prouve sa propriété catalytique.

4° En principe, ces réactions doivent aboutir à un équilibre. Cependant, *on sait par expérience que la réaction évolue généralement dans un*

sens. D'après les publications de la « *Ciba Foundation* » (29, 30) l'équilibre de la réaction dépend du substrat, de sa concentration, des conditions ioniques, de la stimulation de la genèse des lipases ou de son inhibition plus ou moins prononcée [Martin (31)].

L'équation que nous venons de donner est valable pour l'activité des tuberculolipases « *in vivo* » et « *in vitro* ». Nous n'avons cependant trouvé aucune mention dans la littérature, décrivant une synthèse de tuberculoglycérides ou de tuberculolipides réalisée « *in vitro* ».

Par contre, Fabisch (32) a pu obtenir « *in vitro* » la synthèse des glycérides par l'action de *lipase pancréatique*. D'autre part, Swell et Treadwell (33) ont pu démontrer la synthèse « *in vitro* » des esters du cholestérol par *la lipase pancréatique*.

CHAPITRE II

ORIGINE, CONSTITUTION ET ROLE BIOLOGIQUE DES LIPASES

Patnode (34) a trouvé des *tuberculolipases* dans des suspensions homogènes de *Bacilles tuberculeux* de souche H 37 Rv et bovine. *Des auteurs japonais* les ont décelées dans des extraits de souche aviaire du *Bacille de Koch*. Leur présence a été mise en évidence dans des milieux de culture centrifugés du *Bacille tuberculeux Vallée* par A. Sartory et J. Meyer.

Davis et Dubos ont caractérisé les lipases dans des filtrats de culture des *Mycobactéries aviaires, mais ne les ont pas trouvées dans des filtrats de culture de souches humaines et bovines*, du moins à des doses détectables par leurs méthodes.

Prina (35) et Patnode, puis Meyer et Malgras ont pu isoler une lipase *dans le sang de tuberculeux*. Beaucoup d'autres travaux ont eu trait à la recherche des lipases chez le malade. On a souvent essayé de mettre en évidence l'activité lipolytique dans le sang ou le sérum de tuberculeux au moyen du butyrate d'éthyle. Kraut et Burger (36) n'ont pas trouvé de rapport *entre l'activité d'une enzyme tributyrinasique sérique et sa propriété d'hydrolyser les tuberculolipides*. Cette propriété a été attribuée aux leucocytes. De nombreux cas ont été cités dans la littérature concernant la diminution de *la tributyrinase* dans le sérum des tuberculeux. Nous ne citons, à ce sujet, que Scoz et Guzzi (37) et Marconi (38).

Mello et ses collaborateurs (39, 40), Fernandes et ses collaborateurs (41), ainsi que d'autres auteurs *sud-américains* emploient le dosage des lipases dans le sang comme diagnostic de la tuberculose.

Long a constaté dans 75 % de cas de *méningites tuberculeuses* une augmentation de *la tributyrinase*. Kaplan et ses collaborateurs (42, 43) ont décelé une activité lipasique contre l'huile d'olive dans les effusions méningées.

Birath (44) a montré des troubles de l'activité normale des *lipases hépatiques* (estérases?) chez des phtisiques.

D'après Long, les réactions sont positives pour les mono- et tributyrinases dans *le liquide pleural* des tuberculeux. Prina (45, 46) mentionne la présence de lipases dans *les tissus pulmonaires* des phtisiques.

Ces travaux sont confirmés par De Michele (47) dans les pneumothorax.

Yasuda (48) a décelé une activité lipasique dans *les urines des tuberculeux.*

Hattori et ses collaborateurs (49) ont mis en évidence, *par des réactions histochimiques*, une forte activité lipasique dans l'épithélium et les cellules géantes entourant *les nodules tuberculeux.*

L'existence des lipases a été démontrée également *chez les animaux* et nous mentionnons Stoll (50), qui a effectué récemment des recherches sur 294 animaux normaux ou tuberculeux et a décelé des lipases sériques chez ces derniers.

Rôle des lipases chez le sujet tuberculeux:

Davis et Dubos ont, les premiers, constaté une inhibition de croissance du Bacille tuberculeux « *in vitro* », en introduisant du *sérum lipasique* dans le milieu. Dubos (51) a, d'autre part, démontré une action bactéricide sur le Bacille de Koch des *acides gras libres*, dont les plus toxiques sont l'acide caprylique, l'acide caprique et l'acide laurique. L'auteur admet *qu'un pouvoir lipolytique prononcé des Bacilles tuberculeux peut contribuer à l'augmentation de ces acides bactéricides.* L'activité hydrolytique moindre sur les esters à longue chaîne d'acides gras aurait, dans ce cas, une grande importance pour la survie des bactéries. Il semble probable que Mycobacterium tuberculosis possède des moyens métaboliques importants pour inhiber une action lipolytique trop dangereuse, *de sorte que les lipases idiogènes synthétisent la quantité d'acides gras libres juste nécessaire à la vie du bacille de Koch.*

Stoll a mis en évidence, *chez des animaux à tuberculose chronique*, un taux de lipases supérieur à celui d'animaux atteints de *tuberculose maligne* très évolutive. Cet auteur a également pu démontrer que la croissance du *Bacille tuberculeux*, souche H 37 Rv, est plus lente dans les milieux additionnés de lipases spécifiques. Par contre, cette action inhibitrice ne se manifeste pas sur des souches bovines cultivées sur des substrats contenant du sérum humain tuberculeux.

Korth et Bock (52) ont pu augmenter le taux des lipases sanguines chez l'homme et chez le lapin, en leur administrant de *l'huile de foie de morue* et de *l'huile d'olive.* Ces lipases ont augmenté fortement l'activité antibiotique de la plupart des tuberculostatiques spécifiques. Patnode a mis en évidence des *phospholipases* dans les poumons de lapins normaux. Des suspensions bactériennes homogènes ou des filtrats de culture des souches H 37 Rv et bovine n'ont pas montré d'activité lipolytique sur les phospholipides du parenchyme pulmonaire de lapins normaux. L'auteur suppose, par conséquent, *que les lipases pulmonaires normales possèdent des propriétés de défense prononcées contre les tuberculolipases.* Il faut mentionner à ce sujet les résultats déjà cités d'Enemoto, de Gerstl et Tennant (53, 54).

Les travaux de A. Sartory et J. Meyer (55) prennent également place ici : *ces auteurs ont pu obtenir une allergie chez le cobaye par injection de tuberculolipides dégradés préalablement par les lipases spécifiques.* Il semble, par conséquent, que l'hôte élabore des lipases idiogènes contre l'agent infectant; on obtient ainsi une hydrolyse directe des tuberculolipides, ou ces derniers acquièrent indirectement une sensibilité vis-à-vis d'autres facteurs de défense naturelle.

Mise en évidence des lipases:

De l'ensemble des travaux publiés jusqu'à présent, on peut déduire qu'il n'existe pas encore de méthodes sélectives spécifiques et suffisamment sensibles *pour différencier ces tuberculolipases.*

Les méthodes d'identification citées dans la littérature sont aussi diverses que les substrats lipidiques employés, mais elles procèdent toutes du même principe :

On met en contact l'enzyme à examiner avec un substrat donné, dans des conditions fixes de température, de concentration ionique, de durée, etc. *L'activité lipasique est décelée par le contrôle de la modification du substrat lipidique ou par celui des produits de dégradation.* Les réactions sont toujours effectuées parallèlement à des essais témoins.

Pour mettre en évidence les tuberculolipases, on a eu recours à la fois à des méthodes manométriques, titrimétriques, colorimétriques, stalagmométriques, spectrophotométriques, chromatographiques, électrophorétiques, biologiques et d'autres encore. Nous mentionnons succinctement ces méthodes :

Dans *la méthode manométrique*, l'activité lipolytique peut libérer des acides (CO^2) à partir du bicarbonate de soude formé; on mesure, par conséquent, le volume de gaz formé au moyen du *respiromètre de Warburg*, par exemple.

Dans *la méthode titrimétrique*, les acides, mis en liberté à partir des différents substrats lipidiques, sont dosés au moyen de solutions acidimétriques de potasse ou de soude. A ce sujet, nous mentionnons comme substrats : les Tweens [Sierra, Gomori, Archibald, Colowick et Kaplan (56)], l'huile d'olive [Sartory et Meyer, Colowick et Kaplan, Tauber (57)], la tributyrine [Scoz et Guzzi, Marconi, Adinolfi (58)], le butyrate d'éthyle (Sartory et Meyer).

Des renseignements utiles pour l'exécution pratique de ces dosages titrimétrique ont été donnés par Cowgill et Pardes (59), Colowick et Kaplan et Boissonas (60).

Les méthodes colorimétriques et spectrophotométriques nécessitent l'acquisition d'appareils très onéreux, mais elles sont plus sensibles et d'exécution simple, en donnant les densités optiques dues aux produits de la dégradation lipasique. Nachlas et ses collaborateurs, Huggins et Lapides, ainsi que Ravin et Seligman ont publié des méthodes

employant comme substrat des *esters chromogènes*. La méthode stalagmométrique, basée sur la modification de la tension superficielle et la viscosité, a été élaborée par Willstætter et Memmen d'après les travaux antérieurs de Rona et Michaelis (voir 92).

Pour *les méthodes chromatographiques*, nous mentionnons les travaux de Zechmeister et Rohdewald (61, 62, 63) qui ont détecté l'activité enzymatique au moyen de *chromatogrammes en colonne.*

En ce qui concerne *les méthodes électrophorétiques*, les publications de Bloch et ses collaborateurs (64), de Mac Donald (65) ainsi que de Lederer (66, 67) ont montré que des protéines à action enzymatique peuvent être séparées par *chromatographie sur papier* ou par *ferogramme électrophorétique.*

Quant aux *méthodes biologiques*, Davis et Dubos ont décrit une technique très sensible pour rechercher les tuberculolipases. D'autres auteurs ont employé plus récemment des *isotopes* pour marquer radioactivement des substrats lipidiques que l'on introduit dans les milieux de culture.

Finalement nous mentionnons encore d'autres méthodes, telles que celle de Stanly et Ramsay (68) *qui détecte la présence des lipases par diffusion dans une couche de gélose contenant le substrat lipidique.*

Ces méthodes en boîtes de Pétri sur plaque de gélose ont été principalement mises au point par Giri et ses collaborateurs (69, 70). D'autres méthodes semblables ont été décrites par Bulder et par Skerman. Mentionnons encore, à ce sujet, les expériences de Richou et ses élèves (71, 72) qui ont utilisé cette méthode de diffusion pour déceler *des lécithinases et des lipases dans des extraits ou des toxines staphylococciques*, avec, comme substrat, le jaune d'œuf et la graisse de bœuf. Krœhne (73) a contrôlé la valeur de cette méthode au point de vue qualitatif.

Constitution et propriétés physico-chimiques des lipases:

Toutes les enzymes isolées jusqu'à présent *sont de nature protéique* et nous renvoyons à ce sujet à Martin, Colowick et Kaplan, ainsi qu'à Sumner et Myrbæck (74). Ce fait a été également vérifié pour des enzymes microbiennes isolées à l'état cristallisé. C'est pour ces raisons que l'étude des protéines nous permet d'obtenir des renseignements précis sur la constitution et les propriétés des *tuberculolipases.*

Le résumé que nous donnons ci-dessous a été puisé dans la littérature spécialisée, dont nous avons déjà cité la plupart des auteurs auxquels il faut ajouter Lamanna et Mallette (75).

Définition et structure moléculaire des enzymes:

Les enzymes ne sont élaborées que par des cellules vivantes et ne se trouvent dans les substrats naturels qu'en quantité très faible. Ce sont des catalyseurs, dont la molécule (holo-enzyme) est constituée par

l'*apo-enzyme* et la *co-enzyme*. La première est de nature protéique, elle est donc de poids moléculaire élevé et thermolabile. C'est elle qui est responsable de la spécificité de substrat. La co-enzyme n'a pas de structure protéique, elle est de poids moléculaire faible et plus thermostable. On la désigne aussi sous le terme de « *groupement prosthétique* » qui peut, éventuellement, migrer d'une molécule d'apoferment à l'autre.

La fixation de l'apo-enzyme et de la co-enzyme est très variable, de sorte que, dans certains cas, la co-enzyme disparaît, par exemple au cours de dialyses ou de dilutions poussées de l'extrait enzymatique.

Propriétés physico-chimiques des enzymes:

Les enzymes se comportent comme des *amphotères*, puisqu'elles possèdent des groupements libres de NH^2 et de COOH [voir Noller (76)]. Cette propriété joue un rôle important dans la solubilité, l'extraction, la purification et les propriétés d'adsorption des enzymes. Ce dernier caractère est souvent utilisé pour isoler et purifier une enzyme donnée par la méthode chromatographique.

Les enzymes sont des colloïdes et, comme telles, elles sont solubles dans l'eau et certains solvants organiques, par exemple l'éthanol. Leur solubilité dépend de la nature de l'enzyme, de son point iso-électrique, de la température, de la concentration ionique et minérale et de la constante di-électrique du substrat. D'autres facteurs interviennent encore.

Les enzymes sont précipitées dans des liquides à forte concentration d'alcool, d'acétone, d'acides, d'électrolytes (sulfate de magnésium ou d'ammonium), de métaux lourds et également par la chaleur. *La précipitation peut occasionner une modification irréversible de la molécule enzymatique*. D'autre part, ces ferments précipités sont, en général, difficiles à remettre en solution. Les solutions tampon à des pH donnés et à force ionique faible permettent, en général, l'extraction des enzymes. La concentration faible en ions minéraux et un pH faible ont une importance essentielle pour isoler les enzymes par chromatographie sur colonne ou sur papier et pour l'électrophorèse.

Quant à la conservation, on sait que des *solutions concentrées d'enzyme* sont plus stables que des *solutions diluées*. La présence de sels neutres à un taux faible a, en principe, une influence favorable sur la conservation. On a intérêt à éviter la surinfection microbienne des solutions enzymatiques par addition de traces de toluène ou d'un autre antiseptique anodin pour l'enzyme même. Actuellement, on a recours, de préférence, au procédé de lyophilisation pour la conservation des enzymes. Dans ces conditions, la plupart des enzymes garde à peu près son activité. D'autre part, les températures en dessous de 0° maintiennent leur stabilité. On peut également protéger souvent des solutions enzymatiques actives par introduction de certains réactifs, tels la

Cystéine comme agent réducteur, l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique comme agent complexant dans la *chelatométrie*. L'addition de dextrose ou de lactose au produit lyophilisé ou déshydraté facilite sa remise en suspension.

Mécanisme d'action des enzymes:

Les enzymes agissent probablement *en diminuant l'énergie d'activité des réactions catalysées par inhibition de certaines liaisons de protons.* La réaction dépend d'un grand nombre de facteurs : la nature et la concentration de l'enzyme, du substrat spécifique et du milieu ambiant: de la présence d'activateurs, de cofacteurs, d'inhibiteurs; des conditions de pH; du potentiel d'oxydo-réduction [voir : *Transactions...* (77)]; de la tension superficielle et d'autres facteurs encore. La viscosité intervient chaque fois qu'il y a des processus de diffusion, comme c'est le cas dans le métabolisme extra- et intra-cellulaire des *Bacilles tuberculeux.*

Les Bacilles tuberculeux ont certainement la possibilité d'élaborer *des lipases d'adaptation*, à condition de trouver des substances stimulantes dans le milieu ambiant. De tels substrats sont dénommés « *inducteurs* » et la réaction « *induction* ». Le mécanisme de cette réaction n'est pas encore élucidé, de même que la formation et l'action *des enzymes constitutives de Mycobacterium tuberculosis.*

Rôle biologique des lipases dans le métabolisme des Bacilles tuberculeux:

Le taux lipidique *des Bacilles tuberculeux* est évalué, en général, à environ 40 % du poids total de bactéries déshydratées.

D'après les travaux d'Asselineau (78, 79), Boquet et Nègre (80), Asselineau et Lederer (81), Machebœuf et ses collaborateurs (82), Anderson (83), *ces lipides sont partiellement ou entièrement responsables d'une grande partie des propriétés physiques et biologiques des Mycobactéries ;* ils jouent ainsi un rôle dans la provocation de *l'allergie tuberculinique*, dans l'induction de la genèse des anticorps, dans l'acido-alcoolo-résistance, dans l'hydrophobie et, éventuellement, aussi dans la virulence.

Certains lipides sont fixés aux tuberculoprotéines, d'autres forment des combinaisons avec les hydrates de carbone, d'autres encore sont des phospholipides (phosphoglycérides, glycérolipides, glycérophosphatides). Ces phospholipides renferment *des acides gras saturés ou non saturés*, tels que l'acide palmitique, l'acide linolique et l'acide linolénique. On a également pu mettre en évidence des esters d'acides gras acido-résistants contenant du tréhalose; puis on trouve des acides gras neutres et libres. Deux acides sont spécifiques pour *Mycobacterium tuberculosis : l'acide phtioïque et l'acide tuberculostéarique.*

D'après Anderson on distingue dans les cires élaborées par ce germe les fractions A, B, C et D. *La cire A* contient différents *esters de phtiocérol et d'acides gras*, parmi lesquels l'acide mycosérique qui existe à l'état libre ou estérifié; d'après Burrow, il s'agit d'une combinaison hydroxy-méthoxylique. *Les fractions de cire B et C* sont des *glycérides complexes* et *la fraction D* est un *ester polysaccharidique de l'acide mycolique ;* son hydrolyse donne du mannose, de l'arabinose et du galactose.

Les processus du métabolisme lipidique *du Mycobacterium tuberculosis* sont encore peu clairs au point de vue synthèse et dégradation.

D'après Zinsser, on pourrait admettre que ces réactions ont une certaine analogie avec celles qui ont lieu chez les êtres supérieurs.

Le métabolisme et le catabolisme doivent s'effectuer même à l'aide de métabolites à poids moléculaire élevé, au moyen de réactions telles que hydratation-déshydratation, acétylation-désacétylation, oxydation-réduction, etc.

Le rôle biologique des lipases dans le métabolisme des *Bacilles tuberculeux* consiste à *synthétiser et à dégrader des tuberculolipides en catalysant ces réactions.* On ne sait cependant encore rien sur le mécanisme intime de ces réactions, comme nous sommes encore peu renseignés sur les différents métabolites intermédiaires. Le seul dont le rôle est connu est la *glycérine*, stade terminal de la dégradation, intervenant dans les réactions réversibles de synthèse et d'hydrolyse.

Frouin (84, 85, 86) ainsi que Terroine et Lobstein (87) ont déjà démontré, il y a trente-cinq ans, *l'importance de la glycérine pour le développement du Bacille tuberculeux.* Ce fait a été récemment confirmé par Long qui a montré que l'érythritol, le dulcitol et le mannitol ne peuvent pas remplacer le glycérol. Ce dernier influence la synthèse des substances lipidiques spécifiques, desquelles le *Bacille tuberculeux* est très riche.

Long et ses collaborateurs (88) ont cultivé *Mycobacterium tuberculosis* sur des milieux contenant de la glycérine radioactive. Ils ont employé la α-^{14} *C-glycérine* et la β-^{14} *C-glycérine.* Après un certain temps de culture, on fractionna les bactéries par voie chimique pour analyser les différents composants. On acquit ainsi la preuve que *la glycérine constitue une source d'énergie et collabore à la synthèse de tous les constituants importants du Bacille tuberculeux.* Long cite, comme exemple, une analyse au cours de laquelle on retrouva les taux suivants de la radio-activité originale :

15 % dans les tuberculolipides;

12 % dans le CO^2 formé;

2 % dans les tuberculoprotéines solubles;

4 % dans les polysaccharides;

50 % dans d'autres produits métaboliques (acides aminés, sucres, etc.).

Genèse et activation des tuberculolipases:

La genèse des *tuberculolipases* dépend des conditions physico-chimiques que le *Bacille tuberculeux* trouve aussi bien « *in vitro* » que « *in vivo* ». Nous mentionnons comme facteurs intervenant à ce sujet : la température, la valeur de pH, l'âge de la culture; puis, dans l'organisme : l'état physiologique du malade, ses moyens de défense et d'immunité, etc., ainsi que des facteurs d'activation ou d'inhibition.

D'autre part, le tissu ou le milieu ambiant peut exercer une induction sur la production des lipases d'adaptation. « *In vitro* », Thomas et Grainger ont montré qu'un milieu renfermant un taux élevé de glycérine fournit des cultures de *Bacille tuberculeux* possédant un taux lipidique augmenté. Cette augmentation entraîne simultanément une activation de la genèse des lipases, confirmant ainsi les constatations de J. Meyer.

Yamane et ses collaborateurs (89) ont décrit un milieu de culture du *Bacille tuberculeux* contenant, comme unique source glucidique, le *Tween* 80. Le rendement est quatre fois supérieur dans ces conditions, par rapport à celui d'un milieu témoin proposé par Dubos et Middlebrook (90) considéré comme substrat optimal des *Bacilles tuberculeux*.

Il est naturel que la formation et l'activation des lipases trouvent les meilleures conditions à 37°, température optimale de croissance du *Bacille tuberculeux*. Au cours du cycle de croissance de ce germe, on note des variations du pH dans le milieu ambiant, qui se répercutent également sur la formation des lipases. *En effet, si les conditions vitales de la bactérie sont perturbées par la modification du pH, elle est obligée, très probablement, d'élaborer plus de lipases.*

Une diminution de la tension superficielle du milieu de culture au-dessous de 45 dyn/cm^2 se répercute, d'après Lamanna et Mallette, sur la croissance, la multiplication et la morphologie de *Mycobacterium tuberculosis*. Elle occasionne une modification de la perméabilité cellulaire qui influence également la genèse des lipases.

Fisher et ses collaborateurs (91) ont montré que la croissance du *Bacille tuberculeux* évolue suivant une échelle logarithmique au début, suivie par une période arithmétique plus lente. *Il est donc compréhensible*, comme J. Meyer (92) l'affirmait déjà, *que l'on trouve une activité lipasique plus élevée dans les cultures jeunes de Bacilles tuberculeux humains et bovins*. Prina, puis Bloch (93) ont confirmé cette constatation concernant le rapport entre l'activité enzymatique et l'âge des cultures.

Rosenberg et Andrejew (94) ont employé, en connaissance de cause, de *jeunes cultures de Bacilles tuberculeux* se trouvant dans la phase logarithmique de croissance, pour leurs recherches sur les diverses enzymes.

La formation et l'activation des *tuberculolipases* dépendent sûrement des *conditions exo- et endocellulaires*. Celles-ci nous intéressent particu-

lièrement en ce qui concerne la localisation ectoplasmique de ces ferments, permettant ainsi la transformation de substances difficilement perméables en produits facilement diffusibles et pouvant ainsi pénétrer à l'intérieur de la cellule. Ce fait a été prouvé par Rothstein et Meyer (95) pour les *phosphatases* exocellulaires, siégeant à la périphérie des *cellules levuriennes*, au moyen d'expériences avec de l'acide adénosine-triphosphorique (ATP) marqué radioactivement par le ^{32}P.

L'équilibre enzymatique *des tuberculolipases* est réglé par la stimulation de leur genèse et de leur activité (induction), puis par leur inhibition (répression). *Au cours de nos recherches bibliographiques*, nous n'avons pu trouver aucun renseignement sur des cofacteurs et des activateurs des tuberculolipases « *in vitro* » ou « *in vivo* ». Par contre, Cohen et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence « *in vitro* » des inhibiteurs des *estérases mycobactériennes*, tels que le fluorure de sodium, l'arséniate de sodium, le chlorhydrate de quinine et le sulfate d'ésérine.

Toutes les données semblent indiquer une activation des lipases par l'existence de *prolipases ;* nous croyons pouvoir admettre l'existence de *prolipases chez Mycobacterium tuberculosis*, puisque Smith et ses collaborateurs (96), ainsi que Maximox et Bloom (97) *ont pu prouver leur présence dans les extraits enzymatiques pancréatiques*. Dans certaines conditions pathologiques, *ces prolipases pancréatiques* subissent une activation, amenant une dégénérescence de l'organe. Par analogie, *nous supposons que l'activation des tuberculo-prolipases doit se répercuter sur le taux lipasique même et provoquer une diminution des lipides idiogènes des Bacilles de Koch*. Il s'agit là d'une conception purement spéculative, ne reposant sur aucun fait expérimental actuellement connu, de même que le terme de « *tuberculo-prolipase* » n'est pas encore mentionné dans la littérature spécialisée.

CHAPITRE III

ISOLEMENT ET PURIFICATION DES TUBERCULOLIPASES

En principe, les lipases tuberculeuses devraient pouvoir être isolées soit à partir de *suspensions ou d'extraits bacillaires*, soit à partir des *filtrats de culture*, soit encore à partir du *sujet infecté*.

La condition essentielle de cet isolement est d'avoir à sa disposition une quantité de matériel enzymatique brut relativement grande, puisqu'il faut compter avec la labilité et la forte dilution des lipases dans les substrats naturels.

La préparation de ces lipases semble *a priori* la plus aisée par extraction des *Bacilles tuberculeux* mêmes; la meilleure technique, à ce sujet, est empirique au point de vue rendement et pureté. La plupart des méthodes actuelles ayant fourni une enzyme assez pure ont un rendement relativement faible.

Ainsi, Hoshishima (98) a pu obtenir seulement 10 mg *d'estérase cristallisée* à partir de 11 litres de filtrat de culture du *Bacille tuberculeux aviaire*. L'activité du produit final vis-à-vis de l'acétate de butyle comme substrat réactionnel, a été *trois cents fois plus forte* que celle du produit brut initial. Cependant, la perte due aux procédés de purification était de 95 % environ. A partir de 200 g de bacilles déshydratés dans l'acétone, Hoshishima a pu isoler 25 mg d'estérase cristallisée avec une *augmentation de l'activité de* 100 %. Ici la perte était également de 90 %. Hoshishima et ses collaborateurs ont obtenu, à partir de 300 g de Bacilles tuberculeux aviaires desséchés, 27 mg de phospholipase B, dont l'activité était *vingt fois supérieure* par rapport à l'extrait initial.

Il faut en conclure qu'au cours de l'isolement et de la purification, le contrôle de l'activité lipasique doit être effectué à chaque étape de la marche analytique. La valeur de l'activité spécifique renseigne sur le taux d'unités lipasiques pour 1 mg de protéines ou 1 mg d'azote.

Le plan suivant nous donne des directives utiles pour les expériences pratiques.

Homogénéisation de la culture microbienne:

A ce sujet, il faut broyer les cellules pour libérer les *lipases intracellulaires ;* dans les meilleures conditions, toutes les cellules devraient

être éclatées, le contenu cellulaire doit être dispersé d'une façon homogène dans le milieu habituellement constitué par des solutions tampon. On a employé différentes méthodes pour réaliser cette homogénéisation des cellules AAR. Ainsi, Youman et ses collaborateurs (99) ont broyé des cellules du Bacille de Koch souche H 37 Rv après déshydratation dans l'acétone, en les triturant dans un mortier. Heckley et Watson (100) ont eu recours à des billes de verre. Cohen et ses collaborateurs ont employé la même technique, mais en mélangeant les Bacilles de Koch avec une dose double d'oxyde d'aluminium pur. Millman et Darter (101) ont broyé des bacilles H 37 Ra à l'aide de billes de verre dans un broyeur mécanique et à une température de + 4°. Volk et Myrwick (102) ont trituré *Mycobacterium smegmatis* en présence de poudre de verre. Millman et Youman (103) ont employé un broyeur à billes à + 4° pendant plusieurs heures. Rosenberg et Andrejew ont travaillé au froid avec 950 Kc/s *d'ultrasons*. Goldman (104) a également eu recours aux ultrasons. Roulet et Zeller (105) ont trituré les bactéries dans un bac à glace, jusqu'à ce que l'examen microscopique a montré une dislocation partielle des cellules.

Extraction des lipases:

L'emploi de l'acétone pour extraire les lipases se justifie par la possibilité d'une déshydratation rapide en évitant la dénaturation des protéines. La poudre ainsi obtenue est alors déshydratée définitivement sous vide et, après trituration, on la suspend d'habitude dans un liquide généralement constitué par une solution tampon.

L'extraction et toutes les manipulations doivent être effectuées à basse température pour éviter une modification des lipases. On peut mettre en suspension la poudre d'extraction en y ajoutant, au fur et à mesure, le liquide tamponné ou, inversement, introduire, goutte à goutte, la solution d'extrait d'enzyme dans 2 à 20 volumes de solution tampon. Il faut, autant que possible, éviter une *trituration trop énergique* ainsi que *la formation de mousse* pour protéger les protéines.

L'activité lipasique dépend d'un grand nombre de facteurs physico-chimiques; l'extraction répétée peut améliorer le rendement. L'extraction des protéines est en rapport direct, d'après Colowick et Kaplan, avec la concentration ionique en cations neutres ou alcalins, dans l'ordre décroissant suivant : lithium, potassium, sodium. De même les anions agissent dans des suspensions de pH de 7,0 à 14,0 dans l'ordre décroissant : acide pyrophosphorique, acide borique, acide orthophosphorique, acide cyanhydrique, acide carbonique, iode et chlore.

A des pH inférieurs à 7,0, les *tampons citratés* donnent des résultats meilleurs de l'extraction des protéines que les tampons d'acétate.

Heckley et Watson (106) ont obtenu un rendement inférieur en glucides et en acide nucléique en employant pour l'extraction des

Bacilles tuberculeux un *tampon boraté*, mais supérieur en protéines par rapport à l'extraction au *tampon phosphaté*.

Comme liquide d'extraction on emploie, en général, des tampons de concentration molaire de 0,005 à 0,2 ajustés à des pH entre 4,0 et 9,0. Un certain nombre d'enzymes ont leur point isoélectrique entre 4 et 6. Celles-ci sont alors plus facilement extractibles en milieu alcalin. En ce qui concerne l'isolement *des protéines et des enzymes des Bacilles tuberculeux*, nous avons trouvé, le plus souvent, mention des solutions tampon suivantes :

TABLEAU N° 1

Tampon	Concentration mol.	pH	Auteurs
Acétate	—	4,5	Tanaka et coll. (107)
Borate	—	7,6	Heckley et Watson
Phosphate.....	0,01	7,0	Goldman ,Youmans et coll.
Phosphate.....	0,01	7,2	Millman et Darter
Phosphate:.....	0,03	7,4	Rosenberg et Andrejew
Phosphate.....	0,06	7,2	Cohen et coll.
Phosphate.....	0,10	7,0	Millman et Youman

Heckley et Watson ont employé un mélange à parties égales de *soluté physiologique* à 8,0 °/₀₀ et de *tampon phosphaté* de 0,1 mol. ajustant les extraits cellulaires à pH = 7,3. Hoshishima a simplement employé le *soluté physiologique à* 9,0 °/₀₀. Cohen et ses collaborateurs ont trituré les bactéries avec *l'oxyde d'aluminium* et ont extrait ensuite à l'eau distillée. Mentionnons encore que Hoshishima a employé, pour la préparation *des estérases*, une solution à 0,5 % de *saponine*.

Le problème essentiel pour l'isolement de ces tuberculolipases consiste *dans la séparation des substances non protéiques*. A ce sujet, on a recours à la technique suivante :

Dénaturation sélective des protéines:

Pour séparer les protéines indifférentes des protéines enzymatiques, on a eu recours à la *dénaturation sélective*. Goldman a essayé, *sans succès*, la purification d'une déshydrogénase brute par dénaturation à la chaleur et aux acides.

Bevilacqua et Mac Carter (108) ont préparé diverses fractions de *tuberculoprotéines* par dialyse des extraits bruts contre des solutions de *sulfate d'ammonium* aux concentrations suivantes : 0,25 - 0,50 et 0,75 %. Ils ont travaillé à + 5° et à des pH de 7,0 à 7,2.

Hoshishima a employé des solutions de *sulfate d'ammonium* de 0,6 % à 22° pour la préparation de *ses estérases.*

On a également eu recours à des précipitations fractionnées par *l'alcool* ou *l'acétone*, comme l'ont fait Heckley et Watson pour l'alcool et Seibert (109) qui travaille à 0°. Rosenberg et Andrejew ont employé de *l'acétone refroidi* pour précipiter des fractions enzymatiques actives.

Adsorption sélective :

Étant donné le caractère amphotère des enzymes, elles peuvent être adsorbées à condition de travailler dans des zones de pH adéquates. On emploie, à ce sujet, surtout *l'oxyde d'alumine, le charbon actif, le kaolin et des échangeurs d'ions.* L'élution est alors réalisée en modifiant légèrement les concentrations molaires et de pH. Ainsi, Heckley et Watson ont isolé, par exemple, *l'acide nucléique à partir d'un extrait brut par adsorption au phosphate de calcium à pH* = 6,5 *et à* 20°.

Récemment, on a décrit des méthodes de purification chromatographiques pour l'isolement des diverses enzymes. Sober et Peterson (110) ont utilisé la *carboxyméthyl-cellulose* (CM) et la *diéthylamino-éthyl-cellulose* (DEAE) pour purifier *une transaminase.*

Marchis-Mouren et ses collaborateurs (111) ont essayé de purifier des *lipases pancréatiques* par adsorption sur la CM-cellulose et la DEAE-cellulose en présence de phosphate de calcium. Rasmussen (112) a purifié une *préparation de thrombine* au moyen des échangeurs d'ions : mentionnons, à ce sujet, que Hirs et ses collaborateurs (113) ont préparé une *ribonucléase purifiée.* Högberg (114), et plus tard Gœtz (115), ont employé les mêmes techniques pour la purification de *l'Hyaluronidase.* Boman (116) a eu recours au « Dowex 2 » pour séparer diverses protéines du sérum. Quant à nous [Villiger (117)], il nous a été donné de montrer que l'on peut isoler *l'hormone de croissance de l'hypophyse humaine au moyen de la DEAE-cellulose.*

Ce sont surtout Millman et Youman qui ont obtenu diverses fractions enzymatiques des cultures *de Bacille tuberculeux*, groupe H 37 Ra. en employant *la méthode de centrifugation fractionnée.*

Au cours des procédés d'isolement, on sépare les précipités par filtration ou par centrifugation. Lorsqu'on travaille avec des souches virulentes, il est préférable d'employer la centrifugation.

Crowle (118) a montré qu'on peut obtenir des filtrats actifs de *Mycobacterium tuberculosis* à l'état stérile par traitement au moyen de solvants organiques.

Les extraits peuvent être concentrés par ultrafiltration, dialyse ou lyophilisation. Les solvants organiques ou les réactifs d'extraction peuvent, éventuellement, être éliminés par distillation dans le vide.

Au point de vue de la conservation *des enzymes lipolytiques du Bacille tuberculeux*, Colowick et Kaplan *ont montré que des solutions diluées de glycérine ont un effet stabilisant.* A. Sartory et J. Meyer ont obtenu une lipase stable dans *une solution hydro-glycérinée.*

Goldman a pu contrôler l'activité des *hydrogénases* de plusieurs *Mycobactéries*, qui restaient stables pendant plusieurs mois à — 15°. Cohen et ses collaborateurs ont également conservé des estérases pendant plusieurs semaines à — 15°. Nous renvoyons sur d'autres possibilités de conservation citées antérieurement.

Ayant ainsi donné un aperçu général de l'origine, de l'isolement, de la purification et du rôle biologique *des tuberculolipases*, nous avons toutes les données pour organiser nos expériences personnelles.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE IV

ÉTUDE DU POUVOIR LIPOLYTIQUE DES CULTURES DU BACILLE DE KOCH

Culture des Bacilles de Koch:

Pour toutes nos expériences, nous avons eu recours au *Bacille BCG, souche* 546, *de l'Institut Pasteur.* Comme milieu de culture, nous avons employé un substrat synthétique de la composition suivante :

Chlorure d'ammonium	NH^4Cl	1,0 g
Phosphate de sodium bibasique	$Na^2HPO^4.12\ H^2O$	6,5 g
Phosphate de potassium monobasique..	KH^2PO^4	1,0 g
Sulfate de magnésium (solution aqueuse à 10 %)	$MgSO^4.7\ H^2O$	0,2 cc
Solution de chlorure de calcium N/40..	$CaCl^2$	0,2 cc
Solution aqueuse à 0,5 °/oo de chlorure ferrique	$FeCl^3.6\ H^2O$	1,0 cc
Glycérine		60,0 cc
Tween 80		5,0 cc
Eau distillée q.s.p.		1 000,0 cc

Ce milieu liquide est ajusté à pH = 6,8 et stérilisé pendant 20 minutes à 120°. Il est réparti en boîtes de Roux à raison de 200 cc et ensemencé avec 1 cc d'une suspension bactérienne préparée de la façon suivante :

On dépose une petite quantité de Bacilles tuberculeux (BCG) prélevés au moyen d'un ensemenceur stérile dans une culture sur milieu de Lœwenstein, sur un carré de papier Whatman n° 1 stérile, on recouvre d'un second carré de papier et on enveloppe le tout dans encore deux feuilles de papier filtre pour éliminer l'excès d'humidité. On introduit

ensuite les bactéries déshydratées dans un petit pèse-filtre stérile taré et on pèse. On ajoute aseptiquement 3 cc d'une solution tampon phosphaté à 0,05 mol. et à pH = 6,88; de préférence on travaille à 20°. On introduit aseptiquement trois épaisseurs de billes de verre d'un diamètre de 2 à 3 mm. On agite soigneusement, pendant 10 minutes, pour obtenir une suspension homogène que l'on dilue ensuite par addition du tampon phosphaté jusqu'à obtention d'une suspension de BCG de 2 mg dans 1 cc de suspension.

On dispose à l'étuve à 37° pendant 10 à 12 jours. Les cultures ainsi obtenues ont été centrifugées pendant 20 minutes à 3 800 t/mn; on décante le liquide surnageant que l'on stérilise par filtration à travers l'ultrafiltre de Seitz. Nous désignons cet ultrafiltrat par les lettres « FC » (filtrat de culture). Les dépôts de filtration et de centrifugation ont été réunis et nous les désignons par la lettre « R » (résidu). Celui-ci a été lavé à trois reprises au moyen de petites portions de tampon phosphaté de 0,2 mol. et pH = 7,2. On le débarrasse de l'excès d'humidité sur un filtre de verre fritté à l'aide du vide.

Nous avons ainsi obtenu un rendement de 20 à 26 g *de corps bactériens non délipoïdés*, en partant de 20 litres de milieu de culture. Nous représentons la marche de ces manipulations par le schéma suivant :

BCG en milieu liquide
↓
Centrifugation → Résidu de centrifugation
+
Surnageant
↓
Ultrafiltration
↓
Filtrat de culture « FC »

Résidu de filtration
↓
Résidu « R »
↓
Laver, sécher
↓
BCG non délipoïdés

Méthode de dosage des lipases :

Pour contrôler l'activité enzymatique de nos différents produits bactériens, nous avons employé la technique potentiométrique simple et précise élaborée par J. Meyer et ses collaborateurs dans le *laboratoire de microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*. Pour tous les détails de l'appareillage, nous renvoyons aux travaux de Christen (119) et d'Arnold (120); il est composé des éléments suivants :

— pH-mètre titrimètre, type TS (J. Tacusel, *Lyon*);

— Enregistreur électrique avec appareil de contretension et relais (metrawatt, *Nuremberg*);

— Agitateur magnétique (Jouan, *Paris*);

— Calotte de chauffage munie d'un thermostat (Hirtz, *Erstein*);

— Bloc magnétique avec microburette (Prolabo, *Paris*).

L'appareil a été conçu et construit par la *Maison* Electrona, *Strasbourg-Lingolsheim.*

Les substrats lipidiques spécifiques:

Nous avons employé, au cours de nos expériences, les substrats suivants : Huile d'olive, Tween 80, Tween 60, Tween 20, Butyrate d'éthyle. Nous avons préparé extemporanément les suspensions à 20 % de Tween dans l'eau bidistillée. Il en est de même pour le Butyrate d'éthyle. L'huile d'olive a été employée en émulsion stable préparée de la façon suivante :

Nous avons homogénéisé dans un « Turmix » pendant 15 minutes

Solution à 10 % (poids/volume) de gomme arabique pure pour analyses (Pharm. Helv. V)	180 cc
Eau distillée	20 cc
Huile d'olive neutre stérile (Pharm. Helv. V).....	20 cc

Tous les réactifs aqueux ont été préalablement refroidis à + 4°. L'émulsion est fractionnée à raison de 50 cc dans des flacons de verre brun bouchés à l'émeri et stériles; elle est conservée à + 4°. Nous n'avons jamais utilisé d'émulsion âgée de plus de 15 jours.

D'autre part, nous avons préparé une solution aqueuse à 20 % de *Taurocholate de sodium* et une solution tampon que nous désignons, par la suite, par le terme « *tampon Sigma* » et de composition :

Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane *(Sigma Chemical Company)*	0,605 g
Chlorure de calcium	1,013 g
Chlorure de sodium	2,338 g
Eau bidistillée q.s.p.....	1 000,0 cc

Pour nos dosages d'activité lipasique nous avons finalement adopté les cinq mélanges réactionnels suivants :

Émulsion d'huile d'olive	10,0 cc
Tampon Sigma.....	8,0 cc
Solution de taurocholate de sodium	1,0 cc
Eau bidistillée	11,0 à N cc
Extrait lipasique	X cc

Les quatre autres mélanges réactionnels étaient constitués de façon identique, mais l'émulsion d'huile d'olive était remplacée par 10 cc de suspension de :

Tween 80,
Tween 60,
Tween 20,
Butyrate d'éthyle.

Principe du dosage de l'activité lipasique:

Le dosage de l'activité lipasique s'effectue de la façon suivante : Dans un becher de 50 cc, on introduit 10 cc de la suspension lipidique choisie, puis 8 cc de tampon Sigma, 1 cc de solution de taurocholate de soude et 11 à N cc d'eau bidistillée. On mélange soigneusement, puis on dispose sur le thermostat pour chauffer à 37° (± 0,5°). On y trempe l'électrode de mesure et l'électrode de référence, on met l'agitateur magnétique en marche. On ajuste le pH à 8,2 au moyen d'une solution de NaOH N/10 dépourvue de carbonate. On introduit alors rapidement X cc de la solution d'enzymes en étude. Dès que l'aiguille du potentiomètre descend à pH = 8,0 sous l'effet des acides gras libérés, la microburette automatique se débloque et laisse écouler la quantité de NaOH N/10 nécessaire pour ramener le pH à 8,2. Pour chaque mesure, nous avons effectué plusieurs mesures de contrôle. L'appareil enregistreur indique par une courbe l'activité enzymatique de la solution en étude.

Recherche de l'activité lipasique dans le filtrat de culture (FC):

Nous avons recherché dans chaque fois 11 cc de FC l'activité lipasique sur l'huile d'olive, le Tween 80, le Tween 60 et le butyrate d'éthyle *avec un résultat négatif pour l'ensemble des essais.*

Recherche de l'activité lipasique dans les résidus déshydraté (R) et délipoïdé:

Nous avons partagé la récolte du *résidu bactérien non délipoïdé* en trois fractions, dont la première (R-1) est mise en suspension dans une solution tampon phosphatée; la seconde fraction (R-2) est pulvérisée dans le broyeur à billes et la fraction R-3 est extraite selon la méthode que nous indiquons plus loin. Les trois fractions ainsi préparées ont été examinées au sujet de leur pouvoir lipasique.

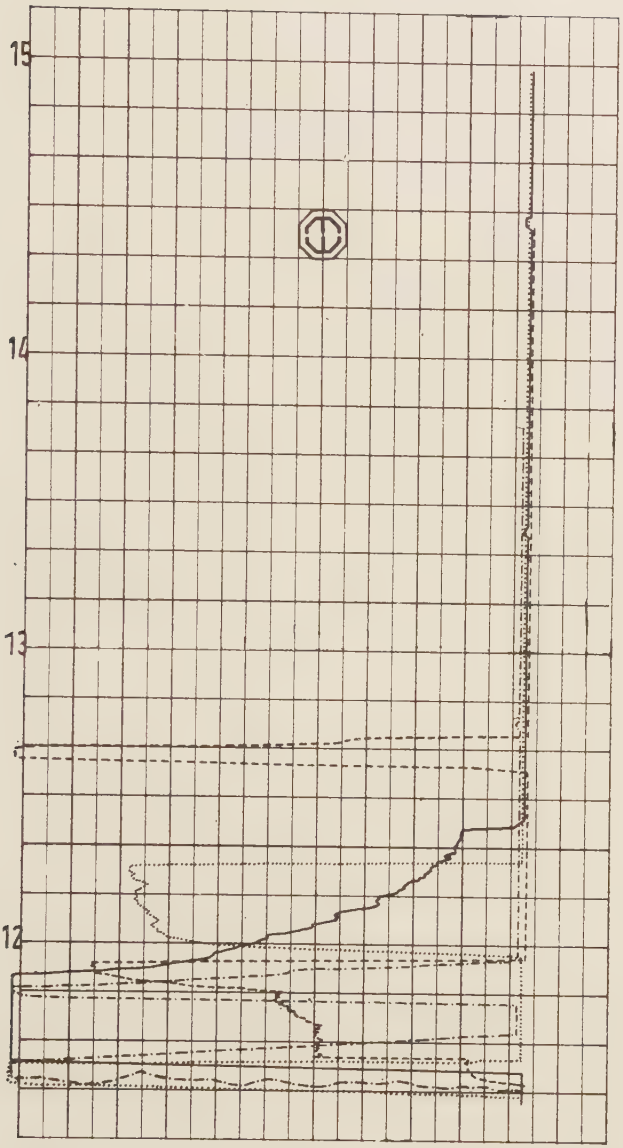


Fig. 1 à 4

Courbes enregistrées au moyen du filtrat de culture (FC) sur : huile d'olive, Tween 80, Tween 60 et butyrate d'éthyle.

Huile d'olive : ——————— Tween 80 : — — — — — —

Tween 60 : — · — · — · — · — · — Butyrate d'éthyle : - - - - - - - - - - - - - - -

Dosage de la fraction R-1:

Pour la fraction R-1 nous avons introduit 100 mg de résidu R dans un flacon stérile contenant trois couches de billes de verre; on y ajoute 3 cc d'une solution tampon phosphatée refroidie de 0,05 mol. et de pH 7,2. On agite soigneusement pendant 15 minutes pour obtenir une nouvelle suspension des bacilles BCG non délipoïdés. Puis, nous introduisons, en deux temps, chaque fois 3,5 cc de solution tampon phosphatée pour obtenir finalement 10 cc de suspension bactérienne R-1. On agite encore pendant 5 minutes. Avant de procéder au dosage de l'activité lipasique, nous avons prélevé aseptiquement quelques öses de suspension pour préparer des frottis que nous avons colorés au Ziehl-Neelsen. Nous avons ainsi pu constater que *l'acido-alcoolo-résistance n'était guère modifiée.*

Nous avons alors employé chaque fois 1 cc de cette suspension pour contrôler son activité lipolytique sur nos quatre substrats spécifiques.

On a ainsi pu constater *un pouvoir lipasique envers tous les substrats.* se manifestant dans l'ordre décroissant : Butyrate d'éthyle, Tweens, Huile d'olive. Il semble, par conséquent, exister dans la suspension R-1 *un complexe enzymatique dont la fraction la plus importante est formée par une estérase d'éthyl-butyrase ; les lipases proprement dites semblent beaucoup moins actives.*

Dosage de la fraction R-2:

Nous avons employé 200 mg de résidu R que nous avons broyés en présence de sable de quartz stérile dans le broyeur à billes refroidi. La poudre a été ensuite reprise dans 10 cc d'une solution refroidie de tampon phosphaté de 0,05 mol. et de pH - 7,2. Cette suspension a été introduite dans un pot à pommade de 50 cc de contenance avec des billes de verre; le pot est fermé hermétiquement à l'aide d'une bande de sparadrap et disposé dans un second récipient d'un volume de 1 000 cc muni d'un mélange de glace et de neige carbonique amenant une température de — 15°. Le tout est disposé dans le réfrigérateur et agité pendant 4 heures à l'aide d'un système rotatoire électrique.

A ce moment, on introduit aseptiquement 10 cc de la solution tampon, ce qui nous donne une concentration de 100 mg de BCG pour 10 cc de suspension. L'examen microscopique est effectué sur quelques échantillons, comme précédemment, et montre, à côté d'éléments cellulaires disloqués, d'autres cellules entières, *le tout ayant conservé sa propriété acido-alcoolo-résistante.*

La suspension est centrifugée à 3 500 t/mn pendant 10 minutes. Nous obtenons une phase surnageante, désignée « SR-2 » et le résidu, composé du sable de quartz et de cellules bactériennes plus ou moins désorganisées, que nous désignons par « RR-2 ».

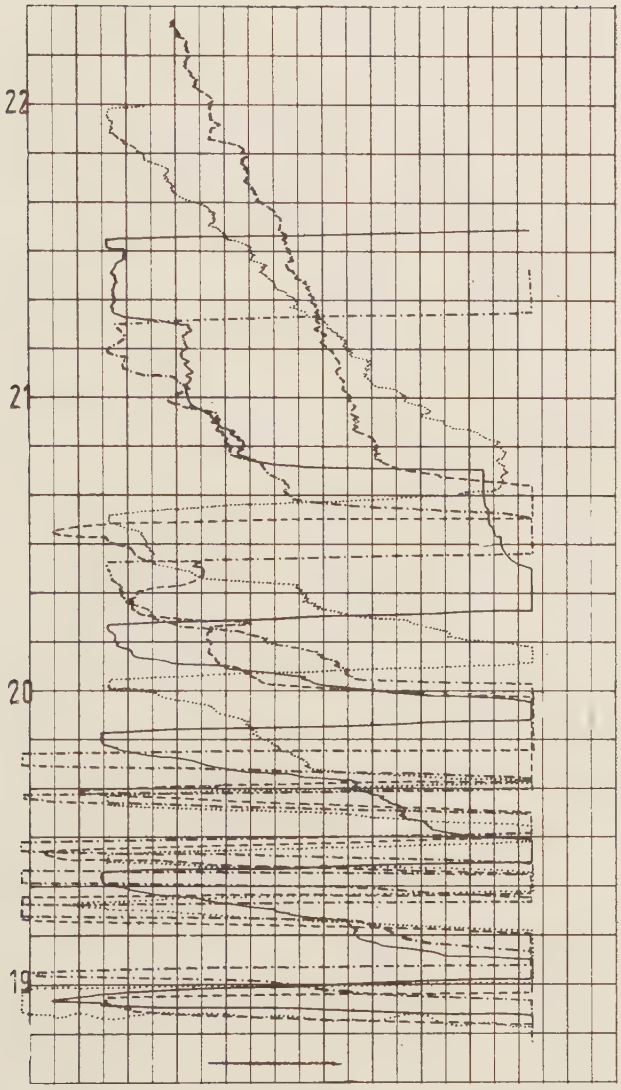


Fig. 5 à 8

Courbes enregistrées au moyen du résidu bactérien (R1) sur : huile d'olive, Tween 80, Tween 60 et butyrate d'éthyle.

(voir la légende des courbes page 35, fig. 1 à 4).

L'activité lipasique du surnageant SR-2 a été contrôlée sur 3 cc, par rapport à l'huile d'olive, au Tween 80 et au butyrate d'éthyle. *Nous avons constaté une activité relativement faible, mais positive et sensiblement identique pour les trois substrats.*

Le résidu RR-2 a été partagé en deux fractions, dont l'une servait pour la réaction au moyen de l'huile d'olive, et l'autre pour le butyrate d'éthyle. *Nous avons ainsi pu constater que* RR-2 *hydrolyse l'huile d'olive d'une façon plus prononcée que le butyrate d'éthyle.* D'autre part, *la fraction* RR-2 *est plus lipolytique que la fraction* SR-2.

Dosage de la fraction R-3:

Pour préparer des *bactéries tuberculeuses délipoïdées*, nous avons employé la troisième fraction du résidu R. Le procédé de délipoïdation était le suivant :

On additionne 15 g de résidu R d'une solution refroidie de tampon phosphaté de 0,05 mol. et pH — 7,2 en quantité telle qu'on obtienne une pâte coulante, que l'on dispose dans un mélange refroidissant de glace concassée et de chlorure de sodium, à — 5°. D'autre part, on refroidit, à — 70°, 500 cc d'acétone fraîchement distillé, au moyen d'un mélange de glace et d'acétone, en y ajoutant encore 5 gouttes d'alcool n-octylique pour éviter la formation ultérieure de mousse. La suspension bactérienne refroidie est alors introduite goutte à goutte dans l'acétone froid. Cette manipulation demande environ 5 minutes, pendant lesquelles on mélange à l'agitateur mécanique; cette agitation est prolongée pendant encore 55 minutes. On laisse reposer, on obtient une phase acétonique surnageante que l'on décante dans des tubes à centrifugation préalablement refroidis: on centrifuge et l'on obtient une couche surnageante que nous désignons par S-1. Le résidu microbien obtenu après cette première extraction a été débarrassé, par distillation dans le vide, des traces d'acétone en excès et nous le désignons par le terme RE-1. Le contrôle microscopique de RE-1, en suspension dans une trace de tampon phosphaté, a montré encore des cellules AAR. Ce résidu RE-1, repris dans très peu de solution tampon phosphaté, est introduit dans 100 cc de n-butanol, refroidi préalablement à — 15°. On ajoute deux gouttes d'alcool octylique et on extrait par agitation pendant 15 minutes. Après centrifugation et décantation nous obtenons une phase surnageante de butanol que nous désignons par S-2.

Le résidu microbien de cette extraction au butanol est appelé RE-2. La délipoïdation est répétée au moyen de 100 cc d'acétone froid par agitation pendant 20 minutes. La phase acétonique surnageante, séparée par centrifugation, est désignée par S-3 et le dépôt par RE-3. Le contrôle microscopique des propriétés acido-alcoolo-résistantes a prouvé que RE-3 n'est toujours pas débarrassé totalement des substances lipidiques.

Ce dépôt RE-3 a ensuite été lavé à cinq reprises au moyen d'acétone froid; finalement on centrifuge et on débarrasse le résidu des dernières traces du solvant dans le vide. Le résidu déshydraté est quantitati-

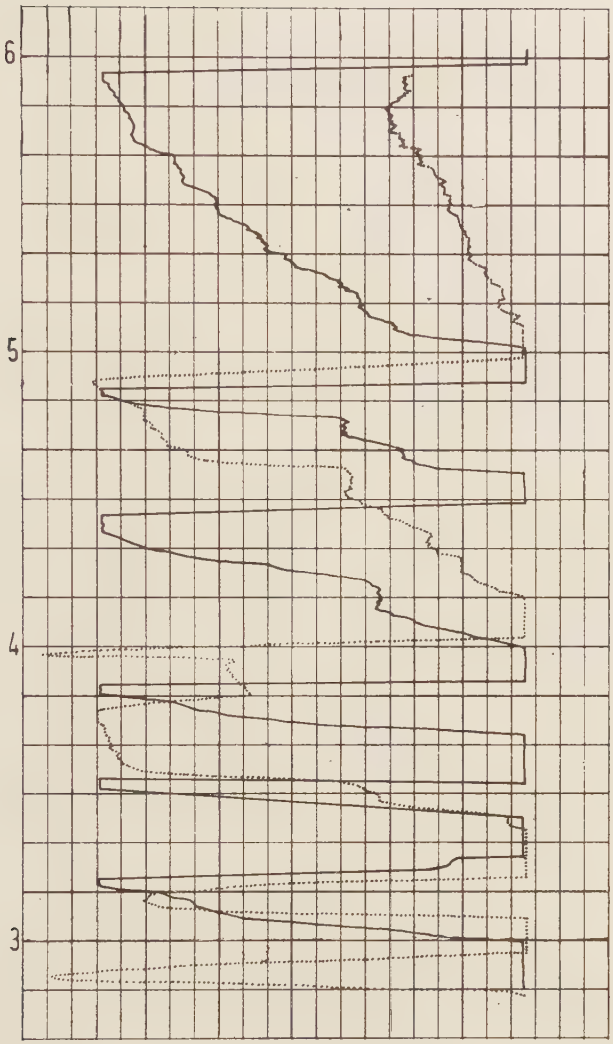


Fig. 9 et 10

Courbes enregistrées au moyen du résidu microbien (extractions RR-2) sur l'huile d'olive et le butyrate d'éthyle. (Légende page 35)

vement introduit dans un pèse-filtre puis on dessèche pendant 48 heures dans le vide sur *Anhydride phosphorique*. Le pèse-filtre est ensuite placé dans l'exsiccateur sur le *chlorure de calcium anhydre*, et le tout est conservé à la glacière.

En partant de 15 g de résidu R, nous avons finalement récolté environ 5 à 7 g de *matériel bactérien délipoïdé*.

Nous résumons ce protocole expérimental dans le schéma suivant :

Résidu R-3
traité à l'acétone à — 70°
↓
Centrifugation et décantation

Surnageant S-1 ← Résidu RE-1
traité par le n-butanol
↓
Centrifugation, décantation

Surnageant S-2 ← Résidu RE-2
traité par l'acétone
↓
Centrifugation, décantation
↓

Surnageant S-3 ← Résidu RE-3
Déshydratation
↓
Matériel bactérien délipoïdé

Recherche de l'activité lipasique dans les surnageants :

Notre premier but était de voir si l'extraction des Bacilles tuberculeux non délipoïdés, au moyen de l'acétone et du n-butanol dans le froid, permettait *d'obtenir une activité lipasique dans la phase surnageante organique.* Nous avons ainsi effectué les essais suivants :

Recherche au moyen d'un mélange S-1 + S-3:

Nous avons réuni quantitativement la phase surnageante S-1 (440 cc) et la phase S-3 (95 cc) et l'avons introduite dans des boyaux de cellulose *(Dialysing Tubing Cellulose* N° 4465-A2, *with flat* 11 4 *inch.. Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, U.S.A.).* Ces boyaux étaient exposés pendant 6 heures dans un courant d'air de ventilateur à la température du laboratoire. Nous obtenons ainsi une évaporation partielle de l'acétone, de sorte qu'il nous reste finalement un liquide de concentration de 150 cc, que nous désignons par « *S*-1 + *S*-3 *conc.* ».

Nous le dialysons pendant 36 heures à 4° contre 900 cc d'eau distillée que nous renouvelons toutes les 8 à 10 heures. Puis nous lyophilisons le contenu des boyaux et le désignons par « *S*-1 + *S*-3 *lyoph.* ».

Nous éprouvons 9 cc de *S*-1 + *S*-3 *conc.* vis-à-vis de l'huile d'olive et du butyrate d'éthyle; l'extrait « *S*-1 + *S*-3 *lyoph.* », d'un rendement très faible, n'a été éprouvé que contre l'huile d'olive.

« *S*-1 + *S*-3 *conc.* » présentait, *avant la dialyse*, une activité plutôt faible sur l'huile d'olive et le butyrate d'éthyle. Nos dosages ont permis de mettre indubitablement en évidence des lipases liposolubles; celles-ci étaient cependant détruites au cours des manipulations de dialyse et de lyophilisation, *puisqu'après ces dernières nos dosages sont restés complètement négatifs*.

La phase surnageante S-2 a été également introduite dans les boyaux de dialysation, concentrée dans le courant d'air jusqu'à obtention de la solution S-2 concentrée, ramenée à 40 cc. Celle-ci était ensuite traitée par dialyse pendant 12 heures à 4° au moyen d'une solution phosphatée de 0,05 mol. et de pH = 7,2. Nous avons employé, à trois reprises, 200 cc de la solution tampon froide. Nous avons recherché, dans 9 cc du « *liquide S*-2 *concentré* », l'action lipolytique vis-à-vis de l'huile d'olive et du butyrate d'éthyle, et dans 11 cc du produit obtenu après dialyse. La durée de cette dernière a été volontairement raccourcie par rapport à celle du « *mélange S*-1 + *S*-3 » et, à la place d'employer de l'eau distillée, nous avons dialysé contre la *solution tampon phosphatée*. Le produit obtenu après dialyse est désigné « *S*-2 *dial.* ».

Lors des dosages, nous avons pu mettre en évidence une activité lipasique contre les deux substrats spécifiques au moyen de « *S*-2 *conc.* »; elle était plus forte vis-à-vis de l'huile d'olive que vis-à-vis du butyrate d'éthyle. Cependant, la durée d'action contre ce dernier restait plus prolongée. Après la dialyse, on retrouvait encore des lipases actives sur les deux substrats, mais l'activité avait diminué par rapport au « *réactif S*-2 *conc.* ». De cette expérience, nous croyons pouvoir déduire *qu'une dialyse de durée moyenne contre la solution tampon phosphatée est moins nuisible aux lipases que la dialyse contre l'eau*. Les ions de la solution tampon paraissent donc exercer une action de protection sur les lipases.

CHAPITRE V

NOUVELLES RECHERCHES DE L'ACTIVITÉ LIPASIQUE DANS LES RÉSIDUS BACTÉRIENS DÉLIPOÏDÉS

Nous avons ensuite mis à l'épreuve la poudre obtenue par extraction acétonique. Dans ce but, nous avons mis en suspension 200 mg de poudre microbienne délipoïdée dans une solution refroidie de tampon Sigma; la concentration de cette suspension était de 10 mg/cc, elle est désignée par le terme PA *(poudre acétonique)*.

Nous avons recherché l'activité lipasique au moyen de 5 cc de cette suspension PA vis-à-vis de l'huile d'olive, du Tween 80, du Tween 60 et du butyrate d'éthyle. Nous avons constaté une activité contre tous ces substrats dans l'ordre décroissant suivant : Butyrate d'éthyle, Tween 60, Tween 80, Huile d'olive. *D'où nous concluons que les bactéries tuberculeuses délipoïdées renferment un complexe de lipases.*

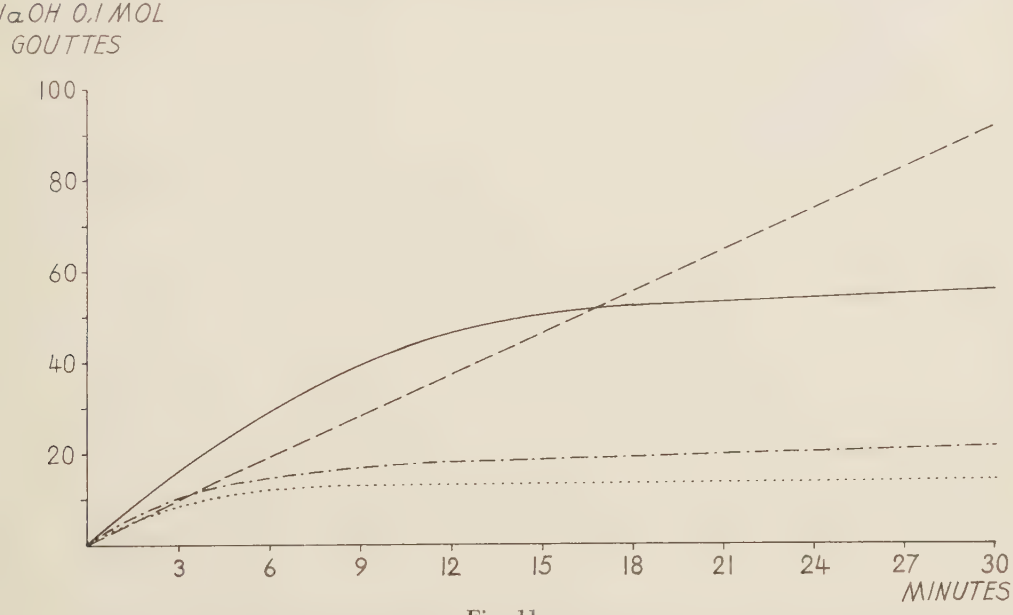


Fig. 11

Enregistrement graphique de quatre courbes enregistrées au moyen de la poudre acétonique (PA) sur l'huile d'olive, Tween 80, Tween 60 et butyrate d'éthyle.

Butyrate d'éthyle : — — — — — Tween 60 : ———————

Tween 80 : - — - — - — - — - — Huile d'olive : - - - - - - - - - - - - - - - - -

Nous avons ensuite essayé d'extraire, à partir des Bacilles tuberculeux délipoïdés, des *lipases oléophiles*, solubles dans l'huile d'olive. A ce sujet, nous avons trituré dans un mortier préalablement refroidi, 100 mg de poudre bactérienne délipoïdée en présence de la même quantité de sable de quartz stérile, avec 10 cc d'huile d'olive neutre stérile, introduite par fractions. La suspension est ensuite agitée sur l'agitateur électrique à la température du laboratoire pendant 20 minutes. Elle est disposée pendant 5 heures à la glacière et agitée chaque heure pendant 1 minute, puis on laisse encore pendant 5 heures à la glacière sans agitation. Par centrifugation et décantation, nous avons séparé la phase huileuse surnageante du dépôt.

Nous avons examiné l'activité lipasique de 4,5 cc de la phase huileuse sur l'huile d'olive et le butyrate d'éthyle. Elle était *négative* pour la première et *très faiblement et lentement positive* pour le second.

D'autre part, nous avons remis en suspension le dépôt de centrifugation, au moyen du tampon Sigma, pour étudier son activité lipasique qui était *fortement positive* en présence de l'huile d'olive (65 gouttes de NaOH N/10 en 30 minutes).

Nous avons poursuivi ces expériences au moyen de la *poudre acétonique* PA pour déceler éventuellement des *lipases glycérinophiles*. A ce sujet, nous avons préparé une suspension glycérinée de 10 mg PA cc. comme dans l'expérience précédente. Par centrifugation et décantation, nous avons encore obtenu une phase glycérinée surnageante et un résidu, pour lesquels nous avons dosé l'activité lipasique, toujours selon le même protocole.

L'extrait glycériné était *dépourvu de toute action lipasique* vis-à-vis de l'huile d'olive et montrait une *faible action hydrolysante* sur le butyrate d'éthyle (32 gouttes de NaOH N/10 en 30 minutes).

Comme on pouvait le prévoir, le résidu de l'extraction glycérinée possédait toujours une *forte activité* lipasique contre l'huile d'olive (85 gouttes de NaOH N/10 en 30 minutes).

En continuant ces expériences, il nous a paru intéressant de rechercher si le Bacille tuberculeux délipoïdé possédait un *complexe enzymatique extractible au moyen de soluté physiologique*. Nous avons donc préparé, comme plus haut, une suspension de 10 mg PA cc dans le soluté physiologique stérile à 0,9 %, ajusté à pH 7,2. La centrifugation finale, pendant 12 minutes à 3 500 t/mn, nous a donné une phase aqueuse limpide surnageante et un dépôt.

Pour déterminer l'activité lipasique, nous avons employé 5,5 cc de la phase aqueuse en présence d'huile d'olive, de Tween 80, de Tween 60, de Tween 20 et de butyrate d'éthyle. Cette expérience a prouvé *la présence de lipases* dans l'extrait aqueux ionisé, *actives contre tous les cinq substrats réactionnels* mis en œuvre. L'intensité lipolytique était la plus prononcée pour le butyrate d'éthyle et diminuait progressivement du Tween 20 au Tween 60, Tween 80 et, finalement, à l'huile

d'olive, *ce qui prouve que l'extraction au moyen de soluté physiologique met en solution surtout des estérases.*

Cette expérience semble indiquer que la présence d'ions exerce probablement un effet protecteur sur les lipases; nous avons donc jugé nécessaire de faire les essais suivants :

Nous avons préparé une solution de 200 mg de PA dans *l'eau bidistillée* et une autre solution de 200 mg de PA dans le *soluté physiologique.* Nous procédons à l'extraction, comme indiqué pour les expériences précédentes, pendant 8 heures à 4° et à un pH = 7,0. Par centrifugation et décantation, nous obtenons deux solutions surnageantes limpides.

L'activité lipasique de 8 cc de chacune de ces deux solutions est examinée en employant l'huile d'olive et le butyrate d'éthyle comme substrat réactionnel. L'extrait de poudre bactérienne délipoïdée dans *l'eau distillée* ne montrait *aucune action* sur l'huile d'olive; nous y avons trouvé des *estérases hydrophiles*, à activité réduite cependant (45 gouttes de NaOH N/10 en 30 minutes). Par contre, nous avons pu déceler *la présence de lipases et d'estérases* dans l'extrait au soluté physiologique (respectivement 81 et 68 gouttes de NaOH N/10 en 30 minutes). On peut en conclure que *la présence d'ions dans le solvant d'extraction occasionne un effet adjuvant protecteur sur les lipases hydrophiles proprement dites.*

Pour ces raisons nous avons jugé nécessaire d'étudier l'influence de tampons phosphatés à des concentrations molaires et à des pH différents sur l'action lipasique d'extraits bactériens délipoïdés. Nous avons donc employé les solutions tampon suivantes, en présence de 100 mg de poudre PA :

TABLEAU N° 2

N°	Tampon de :	Concentration	
		molaire	ionique
1.....	phosphate	0,05	6,7
2.....	phosphate	0,20	6,8
3.....	phosphate	0,05	7,2
4.....	phosphate	0,20	7,4
5.....	phosphate	0,05	7,7
6.....	phosphate	0,20	8,0

L'extraction et la séparation étaient toujours pratiquées comme nous l'avons décrit antérieurement et nous avons ainsi obtenu six solutions limpides et six dépôts de centrifugation. Pour déterminer l'activité lipasique de ces extraits, nous avons chaque fois éprouvé 4,5 cc du surnageant par rapport à l'huile d'olive et au butyrate d'éthyle.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons pu constater que *le tampon n°* 2 avait l'activité lipasique la plus prononcée vis-à-vis de l'huile d'olive, suivi des solutions n° 4, 1, 5 et 3; ces trois dernières présentaient cependant une activité lipasique beaucoup plus faible et dans l'extrait n° 6 aucune lipase n'était décelable. Nous rapportons, à titre documentaire, les courbes n° 12 et 13 enregistrées par l'appareil Metrawatt.

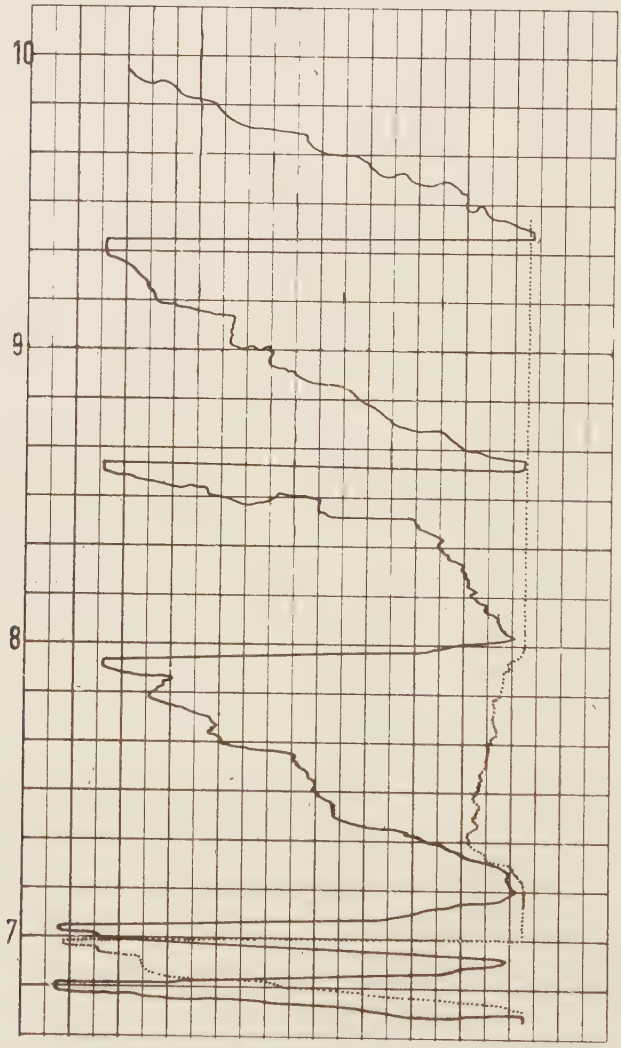


Fig. 12 et 13

Courbes enregistrées au moyen de l'extrait préparé au moyen de tampon phosphaté n° 2 et n° 4 sur l'huile d'olive et le butyrate d'éthyle.

Tampon N° 2: ——————— tampon N° 4: - - - - - - - - - - - - - - - - -

De l'ensemble de ces recherches on peut conclure qu'une solution tampon phosphatée de 0,2 mol. et de pH — 6,8 à 7,4 possède le pouvoir solubilisant optimal pour *les « lipases proprement dites »*.

Les mêmes extraits montraient une *activité estérasique*, dont la plus puissante revient à la solution n° 3, suivie de n° 2, puis de n° 1, 4 et 5; la solution n° 6 contenait la quantité la plus faible d'estérases. Les extraits estérasiques actifs étaient, en général, plus puissants dans l'unité de temps que les extraits lipasiques.

Essai d'isolement et de purification des lipases:

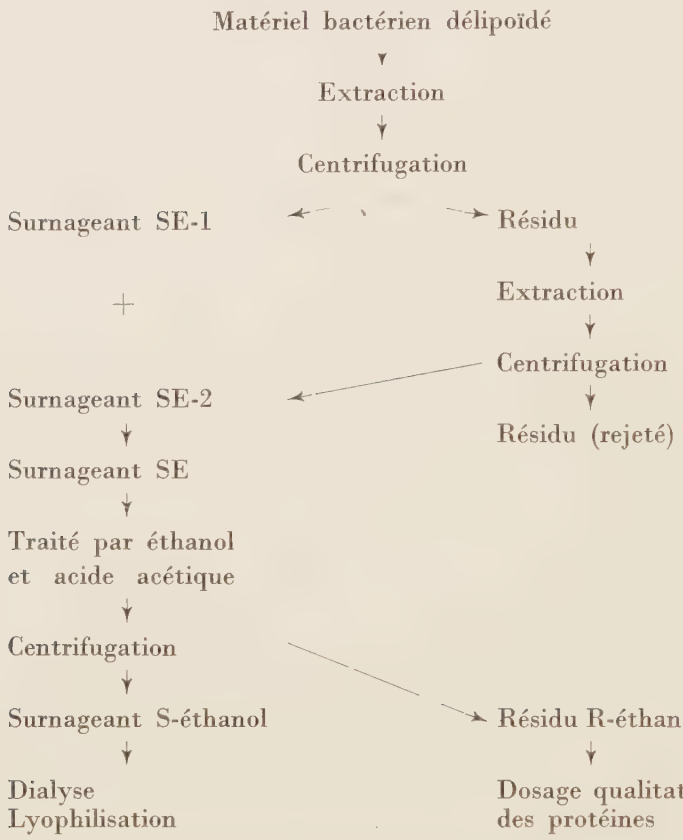
Ayant constaté dans les expériences précédentes la possibilité d'extraction des lipases dans des conditions données, nous avons jugé nécessaire de pratiquer l'isolement et la purification de ces enzymes de structure protéique. A ce sujet notre choix s'est fixé sur *l'éthanol*, puisque le sulfate d'ammonium ou les autres sels neutres nous ont semblé moins indiqués, étant donné leur action en rapport avec la concentration et la température sur la dissolution des protéines.

Nous avons élaboré le protocole expérimental suivant : On triture, dans un mortier refroidi, 4 g de poudre bactérienne délipoïdée en présence de 2 g de sable de quartz stérile avec un tampon phosphaté de 0,2 mol. et pH = 6,8. Cette solution est ajoutée progressivement, jusqu'à 80 cc, pour obtenir finalement une suspension homogène. Celle-ci est mélangée pendant 30 minutes au moyen d'un agitateur électrique, puis disposée pendant 5 heures dans la glacière, en agitant pendant 1 minute toutes les heures. On laisse encore 5 heures à la glacière, puis on centrifuge et décante pour obtenir la phase surnageante SE-1 *(surnageant-éthanol)* ; le résidu de centrifugation est encore épuisé pendant 3 heures à 4°, mais cette fois-ci avec un tampon de pH — 7,4. Par centrifugation nous avons récolté une deuxième phase aqueuse surnageante (SE-2) et le résidu est rejeté.

Les phases SE-1 et SE-2 sont réunies pour obtenir la phase unique SE. En y introduisant de l'alcool à 95° pour obtenir une concentration alcoolique de 31 %, on ajuste ensuite le pH à 4,8 par addition d'acide acétique dilué sous agitation continue. Le mélange ainsi préparé est disposé pendant 10 heures à 4°, puis centrifugé pour obtenir un précipité protéique que nous désignons « *R-éthanol* ».

Une petite fraction de ce *R-éthanol* a été contrôlée par *la réaction du Biuret*, qui était positive pour les protéines. La phase liquide surnageante, traitée par l'alcool et l'acide acétique, est désignée « *S-éthanol* »; elle est dialysée pendant 8 heures à 4° contre une solution tampon phosphatée de 0,05 mol. et de pH = 7,2. La solution tampon, à raison de 300 cc, est renouvelée toutes les 2 heures. Après la dialyse, nous avons lyophilisé le « *S-éthanol* ».

Nous résumons la marche expérimentale par le schéma suivant :



Dosage des lipases dans le S-éthanol et le R-éthanol:

Le produit lyophilisé *S-éthanol* est repris dans 10 cc de *tampon Sigma* et nous avons employé chaque fois 5 cc de cette suspension pour contrôler l'activité lipasique vis-à-vis de l'huile d'olive et du butyrate d'éthyle. *Les résultats ont été négatifs.*

Le résidu *R-éthanol* est également repris dans 10 cc de *tampon Sigma* et son activité lipasique contrôlée comme ci-dessus. Ici aussi, *les résultats sont restés négatifs.*

Nous pouvons en conclure que *le fractionnement par l'éthanol ne se prête pas à l'extraction des lipases des bacilles AAR.*

Dosage des protéines:

Pour établir une relation entre le taux de lipases et la concentration en protéines, nous avons eu recours à une méthode colorimétrique au

moyen du *photocolorimètre Lumetron*, modèle 402 E, en employant *la réaction du Biuret* qui est suffisamment sensible (voir *Journ. biol. chem.*, 1949, 177, 751). Le taux de protéines lipasiques est évalué par comparaison avec une solution-test de protéines. Nous donnons ci-dessous les réactifs nécessaires au dosage de la solution standard de protéines :

— Solution aqueuse à 10 % de NaOH;
— Solution aqueuse à 1 % de $CuSO^4$;
— Solution standard de protéine :

Nous avons utilisé, à ce sujet, l'albumine sérique bovine cristallisée, fraction V *(Armour Company)*, que nous diluons dans le soluté physiologique stérile jusqu'à une concentration finale de 2,5 mg/cc. A partir de cette solution-mère, nous avons préparé deux autres solutions-test à la concentration de 1,25 mg/cc et de 0,625 mg/cc.

La méthode de dosage est la suivante : De chaque solution standard nous introduisons dans des tubes à hémolyse 0,2, 0,3, 0,5 et 0,7 cc; nous complétons à 0,7 cc au moyen d'eau bidistillée, ce qui nous donne les gammes de concentrations suivantes :

TABLEAU N° 3

Solution-standard	Prélèvement cc	Concentration finale en protéines mg
2,5 mg/cc	0,2	0,500
	0,3	0,750
	0,5	1,250
	0,7	1,750
1,25 mg/cc	0,2	0,250
	0,3	0,375
	0,5	0,625
	0,7	0,875
0,625 mg/cc	0,2	0,125
	0,3	0,187
	0,5	0,312
	0,7	0,437

On introduit ensuite dans chaque tube 2 cc de NaOH et 0,3 cc de la solution de sulfate de cuivre; on mélange soigneusement et on dispose pendant 10 minutes à l'obscurité, puis on mesure l'intensité de coloration au Lumetron muni d'un filtre de 550 Å. Les mesures ont été effectuées par comparaison avec des solutions témoins contenant, à la place des solutions protéiniques, du soluté physiologique. Le Lumetron était ajusté à la transmission de 100° à l'aide de ces témoins.

Le tableau suivant donne les résultats que nous avons mesurés :

TABLEAU N° 4

Concentration en protéines mg	Degrés Lumetron
0,125	99,0
0,187	97,7
0,250	97,0
0,312	95,7
0,375	95,0
0,437	94,0
0,500	89,5
0,625	91,0
0,750	89,5
0,875	87,5
1,250	83,5
1,750	76,0

Nous enregistrons ces valeurs dans un graphique où nous inscrivons les degrés Lumetron en *ordonnée* et le taux de protéines en *abscisse*. La courbe ainsi obtenue nous servira de référence pour déterminer le taux protéique de nos lipases purifiées.

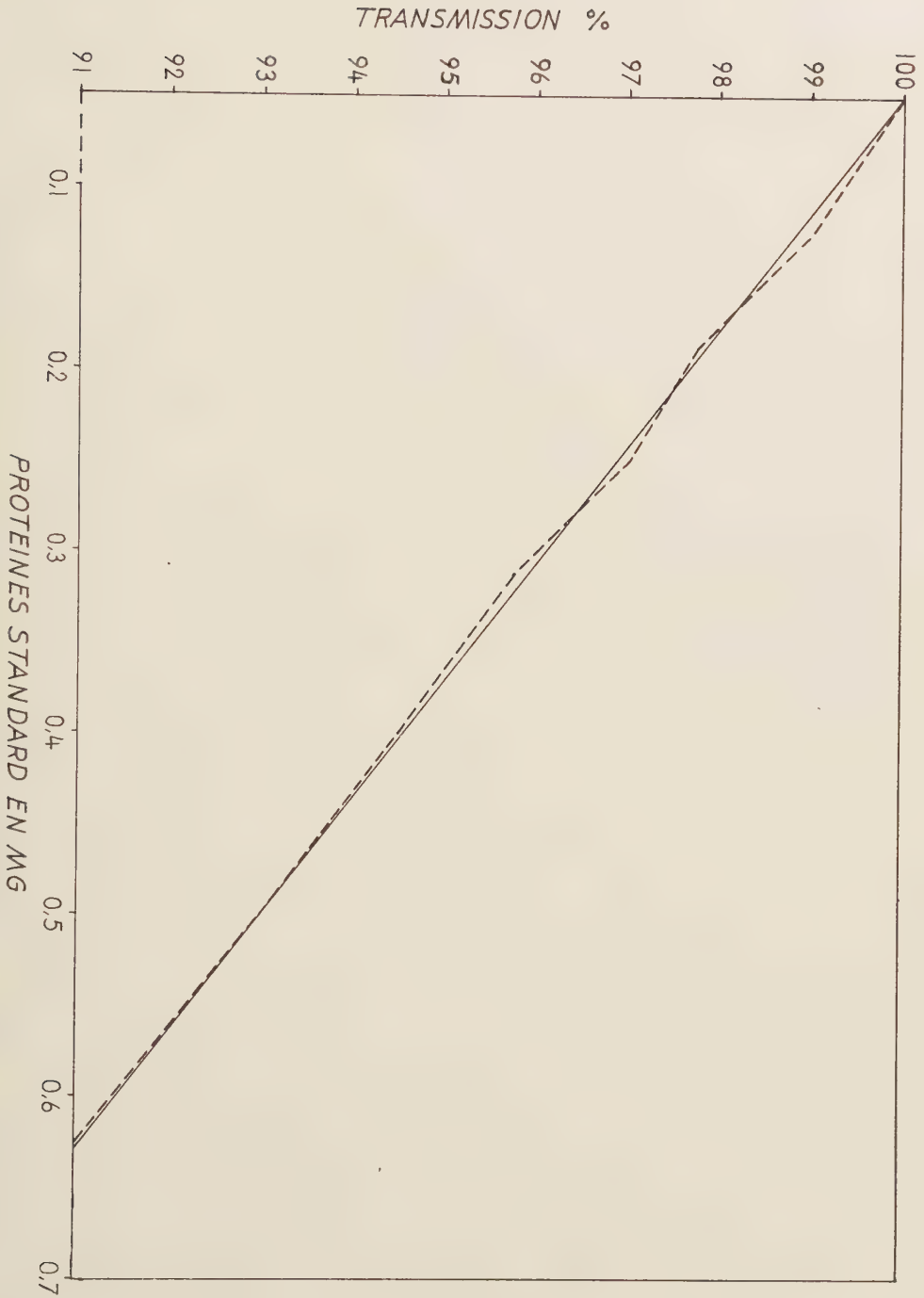


Fig. 14

Graphique exprimant le taux de protéines en degrés Lumetron.

CHAPITRE VI

ESSAI DE PURIFICATION DES LIPASES PAR CHROMATOGRAPHIE

A ce sujet, nous avons adsorbé les lipases extraites dans différentes solutions tampon sur de la *cellulose* DEAE, puis nous les avons éluées de cet échangeur d'anions. Nous avons employé les systèmes tampon suivants :

Tampon citraté phosphaté ..... pH = 6,9

Tampon phosphaté ..... pH = 6,8

Tampon phosphaté ..... pH = 6,9

Tampon d'acide borique-borate de soude..... pH = 7,3

Tampon d'acide borique-borate de soude..... pH = 7,6

Tampon Sigma ..... pH = 7,9

La préparation des tampons citratés phosphatés et des tampons acide borique-borate de soude est effectuée d'après les indications de Colowick et Kaplan.

Nous avons chaque fois extrait 300 mg de *matériel bactérien délipoïdé* avec 20 cc de chacune des six solutions-tampon, en agitant pendant 8 heures à la température de 4°. Par centrifugation et décantation, nous obtenons ainsi six solutions d'extraction, dont nous employons 0,7 cc pour le dosage des protéines au moyen de *la réaction du Biuret.* Les résultats sont toujours établis par rapport à une solution témoin contenant, à la place de l'extrait, 0,7 cc de la solution tampon correspondante; ces solutions servent à régler le Lumetron à 100° de transmission. Nous donnons, dans le tableau ci-dessous, le taux de transmission correspondant aux six extraits :

TABLEAU N° 5

0,7 cc de solution tampon	Degrés Lumetron	
	avant adsorption sur DEAE	après adsorption sur DEAE
Citraté-phosphaté pH = 6,9	95	100
Phosphaté pH = 6,8	93	100
Phosphaté pH = 6,9	96	100
Acide borique-borate Na pH = 7,3	92	98
Idem pH = 7,6	95	97
Sigma pH = 7,9	96	100

Interprétation:

En considérant ce tableau, on note dans la série témoin que le tampon acide borique-borate de soude à pH = 7,3 dissout le mieux les protéines, suivi du tampon phosphaté à pH 6,8, alors que les quatre autres tampons ont un pouvoir de dissolution des protéines sensiblement identique, mais plus faible.

En ce qui concerne l'adsorption sur la *cellulose* DEAE, nous avons tout d'abord équilibré 0,5 g de cet échangeur d'anions au moyen de 5 cc de chacune des solutions tampon refroidies. Puis nous ajoutons 7 cc de l'extrait protéique refroidi; on agite pendant 30 minutes à la température du laboratoire et laisse reposer pendant 30 minutes au réfrigérateur sans agitation. Après centrifugation, on décante la phase surnageante, que l'on centrifuge une seconde fois.

Pour obtenir un réactif témoin, nous avons préparé, de la même façon, des solutions au moyen de 12 cc de la solution tampon donnée et de 0,5 g de *cellulose* DEAE. On prélève 0,7 cc de chaque centrifugat pour y effectuer la réaction du Biuret. Nous avons étalonné le Lumetron à 100° à l'aide de ce réactif témoin.

On procède alors de la même façon avec les extraits protéiques obtenus avec les six solutions tampon.

En comparant les valeurs des deux colonnes du tableau, on constate qu'une adsorption quantitative de protéines sur la *cellulose* DEAE est obtenue avec les quatre solutions tampon: *citraté-phosphaté, phosphatés* et *Sigma*. Par contre, la solution tampon *acide borique-borate* ne permet qu'une adsorption partielle des protéines.

Recherche du pouvoir lipasique des solutions de protéines:

Ces expériences étaient également effectuées sur chaque fois 7 cc des six solutions tampon avant et après traitement au moyen de la *cellulose* DEAE. Le pouvoir lipasique a été contrôlé sur l'huile d'olive.

Ces dosages ont donné les résultats suivants, comparativement aux différentes solutions-tampon :

TABLEAU N° 6

Solution-tampon	pH	Protéines Degrés Lumetron	Lipases (NaOH N/10 gouttes)	
			avant traitement	après traitement
Citrate-phosphate	6,9	93	23	4
Phosphate.....	6,8	89	60	6
Phosphate.....	6,9	91	39	4
Acide borique-borate	7,3	87	63	21
Acide borique-borate	7,6	92	27	17
Sigma	7,9	95	16	3

Avant le traitement par l'adsorbant, nous avons constaté une activité lipasique de tous les extraits; cependant, l'intensité lipolytique était la plus prononcée dans l'extrait préparé avec le *tampon acide borique-borate de soude* à pH = 7,3, suivi de l'extrait au *tampon phosphaté* de pH = 6,8.

En considérant ces résultats, nous pouvons conclure *qu'il existe une proportionnalité directe entre le taux de protéines et l'activité lipasique.*

Après avoir soumis nos extraits protéiques au traitement par la *cellulose* DEAE, nous avons également employé 7 cc de chaque solution éluée pour déterminer la présence éventuelle de lipases, à l'aide de l'huile d'olive comme substrat réactionnel. Nous n'avons pas pu déceler d'action lipasique dans les centrifugats des extractions aux tampons *citraté-phosphaté*, *phosphatés* et *Sigma*. Par contre, nous avons encore décelé une action lipasique relativement faible dans les extraits au tampon *acide borique-borate*, ce qui confirme notre conclusion ci-dessus.

Essai d'isolement par chromatographie des lipases adsorbées:

A ce sujet, nous avons préparé une colonne d'adsorption au moyen de *cellulose* DEAE que nous avons ajustée à pH = 6,8 en y introduisant dix parties de tampon phosphaté de 0,05 mol. La colonne de cellulose est ensuite purifiée par plusieurs lavages à l'aide de solution tampon. Les particules trop fines, se sédimentant lentement, ont été éliminées par décantation. Finalement, nous avons transvasé la suspension d'adsorbant dans une colonne de chromatographie. La *cellulose* DEAE s'entassait spontanément au fur et à mesure de l'écoulement

du tampon; elle a été comprimée au moyen de pression d'air pour obtenir une colonne à hauteur constante de 15 cm de haut et de 0,9 cm de diamètre, que nous avons encore lavée plusieurs fois avec la solution tampon. Toutes nos expériences ont été effectuées à température et pH stables.

Pour préparer un extrait protéique et lipasique de nos *Bacilles tuberculeux délipoïdés*, nous avons employé 500 mg de poudre acétonique PA qui ont été extraits à 4° pendant 10 heures par la *solution tampon phosphatée* de 0,20 mol. et de pH = 6,8. Par trois centrifugations et décantations successives, nous avons obtenu une solution limpide de 20 cc.

Cette solution est introduite par fractions de 5 cc sur la colonne d'adsorption équilibrée qu'elle imbibe spontanément. L'adsorption terminée, nous avons procédé à l'élution des protéines porteuses de lipases en modifiant légèrement le pH et la concentration molaire, pour sauvegarder la constitution de l'éluat. Nous avons procédé à une élution progressive, en employant tout d'abord 100 cc d'une *solution phosphatée* de pH = 6,8, puis un *tampon de phosphate bisodique* de 0,05 mol. et de pH = 6,9, additionné progressivement d'une *solution de chlorure de sodium* de 0,5 mol. Cette dernière devait augmenter vers la fin de l'élution la concentration saline. L'écoulement du liquide d'élution était réglé par pression d'air, de façon que nous puissions recueillir 12 à 15 cc d'éluat à l'heure. Celui-ci a été capté dans des tubes à essai à raison de 7 cc.

Sur 0,7 cc de chacun de ces éluats, nous avons effectué *la réaction du Biuret* et nous donnons les valeurs trouvées au Lumetron dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 7

Fraction N°	Degrés Lumetron	Fraction N°	Degrés Lumetron
1 - 11	100	23	93
12	93	24	93
13	96	25	92
14	95	26	92
15	95	27	92
16	95	28	93
17	94	29	95
18	93	30	95
19	92	31	96
20	93	32	98
21	91	33	98
22	92	34 - 44	100

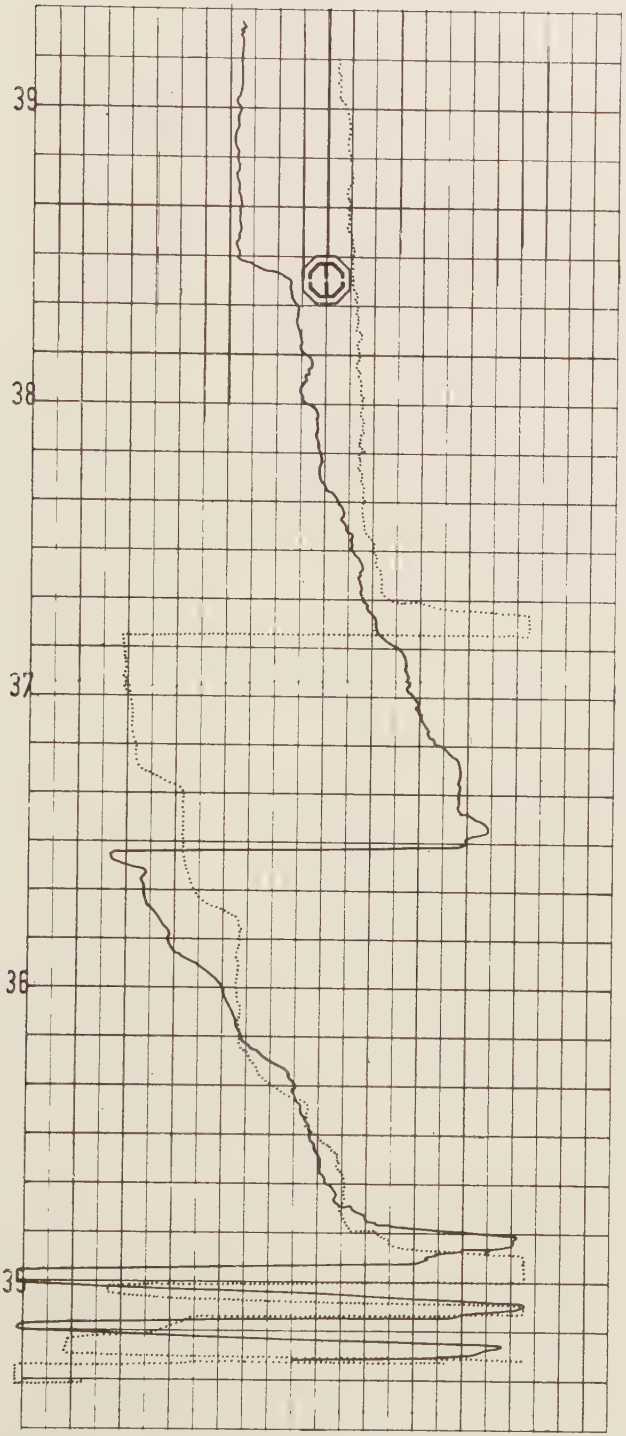


Fig. 15 et 16

Courbes enregistrées au moyen des fractions d'éluat N^{os} 19 et 21 de Bacilles tuberculeux délipoïdés sur l'huile d'olive.

Fraction d'éluat N^{0} 21: ————————

Fraction d'éluat N^{0} 19: - - - - - - - - -

Notons que le Lumetron était étalonné à 100° au moyen de fractions d'éluat préparées avec la solution-tampon seule.

On voit que le taux de protéines le plus élevé se trouve dans la fraction n° 21, suivie des fractions n° 19, 22, 25, 26 et 27.

Pour le dosage des lipases contenues dans ces fractions protéiques, nous avons choisi les fractions n° 21, 19, 25 et 12. Les échantillons n° 19 et 25, qui contenaient le même taux de protéines, devaient nous servir de témoins de la valeur de la réaction, qui était effectuée à l'aide de l'huile d'olive comme substrat réactionnel.

A l'aide des résultats que nous avons obtenus, nous avons calculé le taux lipasique par rapport à la concentration en protéines des différents éluats, étant donné que nous avons constaté antérieurement une proportionnalité directe entre le taux de protéines et le pouvoir lipasique. Nous rapportons, dans un graphique, le taux des lipases dans les différentes fractions obtenues après *purification chromatographique par adsorption sur la cellulose* DEAE et calculées par rapport aux taux de protéines.

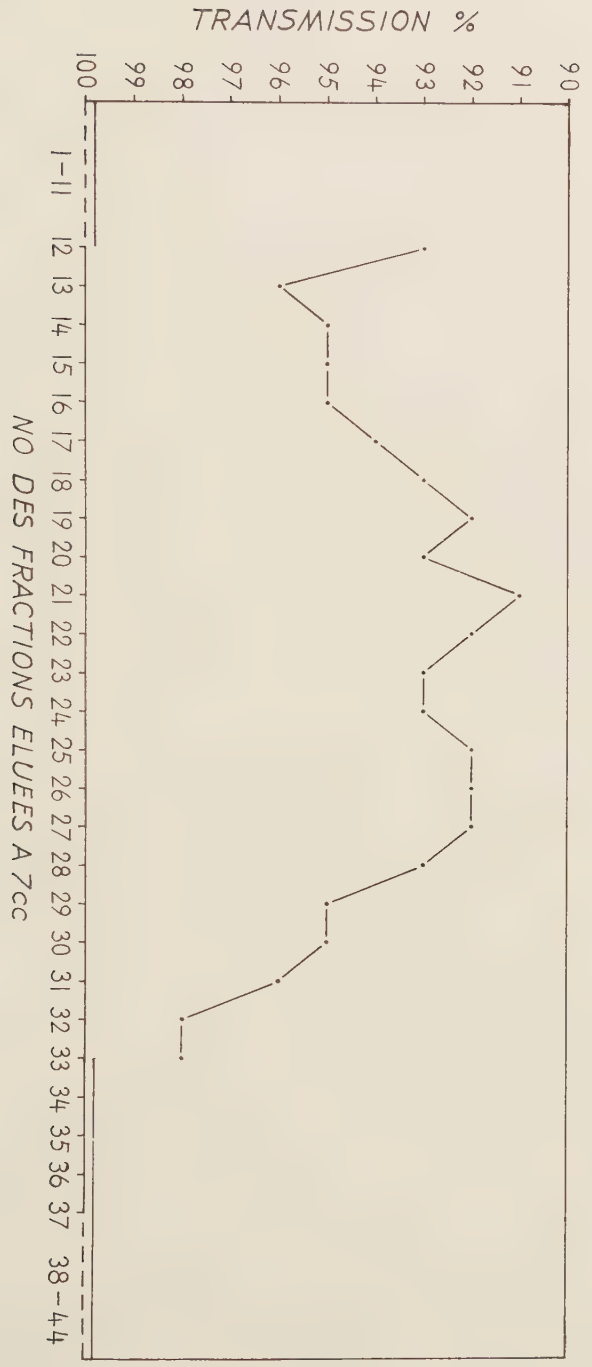


Fig. 17

Graphique montrant le rapport entre le taux de lipases et celui des protéines.

CHAPITRE VII

FORMATION D'ANTILIPASES PAR INJECTION DE NOS LIPASES PURIFIÉES

Nous avons préparé nos lipases au moyen de chromatographies en séries sur six colonnes de 20 cm de longueur et 1,2 cm de diamètre. A ce sujet, nous avons employé 5 g de *Bacilles tuberculeux* BCG *délipoïdés*. Le procédé d'élution était identique à celui précédemment décrit, et nous avons finalement réuni les fractions d'éluat de n° 12 à 32. L'ensemble a été concentré par lyophilisation pour obtenir un produit lipasique déshydraté.

Afin de contrôler le pouvoir lipolytique, nous avons mis 100 mg de la poudre lyophilisée en suspension dans 10 cc de *solution tampon Sigma*, puis nous avons effectué les dosages enzymatiques sur l'huile d'olive. Ces recherches nous ont prouvé la présence d'une quantité importante de lipases.

Pour nos expériences « *in vivo* » nous avons eu recours à des souris auxquelles nous avons injecté, dans la veine latérale de la queue, 200 mg de produit lyophilisé dans une *solution isotonique de lactose*. Les solutions injectables avaient une concentration finale de 20 mg/cc. Nous avons injecté six souris d'après le schéma suivant, de sorte que chacune recevait au total 12 mg de produit lipasique.

TABLEAU N° 8

Jour	Dose injectée	Produit lyophilisé
1er	0,1 cc	2 mg
4e	0,15 cc	3 mg
8e	0,15 cc	3 mg
12e	0,20 cc	4 mg

Parallèlement, nous avons injecté à une série de souris témoins, aux mêmes dates et dans les mêmes conditions, une solution isotonique de lactose stérile.

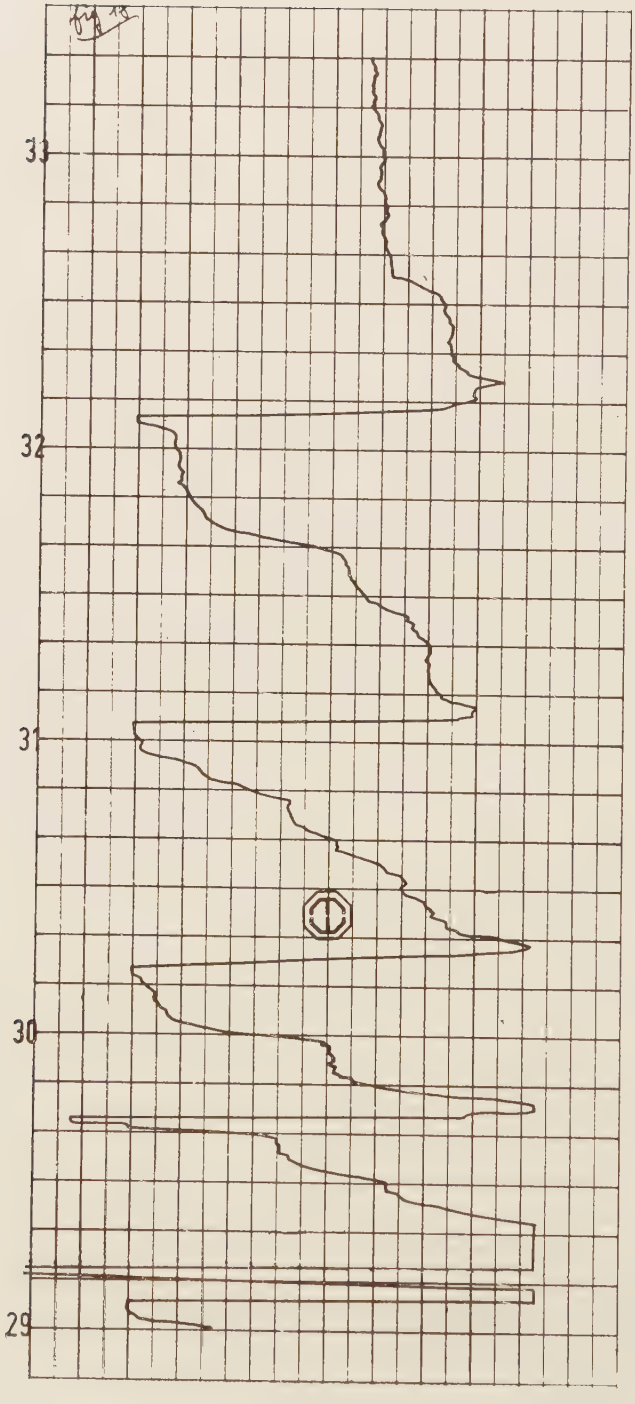


Fig. 18

Courbe enregistrée au moyen de la lipase de 100 mg de poudre bactérienne délipoïdée sur l'huile d'olive.

Douze jours après la quatrième injection, on a prélevé le sang des deux séries de souris, qu'on a laissé coaguler pour décanter le sérum après centrifugation. D'autre part, nous avons préparé une solution dans le *tampon Sigma* de 30 mg/cc *de poudre lyophilisée des fractions lipasiques éluées comme ci-dessus.*

Nous avons ensuite chaque fois introduit, dans 2 cc du sérum des souris des deux séries, 8 cc de la solution lipasique tamponnée. On mélange soigneusement et on dispose les deux séries d'expériences à 37° pendant 1 heure, puis on effectue le dosage des lipases comme d'habitude, en présence d'huile d'olive.

Nous avons ainsi pu constater une activité lipasique dans les deux sortes de sérum, *mais celui des souris traitées par injection de lipases montrait une activité moindre.* Nous ne pouvons nous expliquer ce fait que par une formation *d'antilipases* à la suite de la vaccination des animaux au moyen de nos lipases purifiées provenant de la poudre de BCG délipoïdée. Nous donnons, dans les tableaux suivants, la dose de NaOH N/10 nécessaire pour neutraliser les acides gras mis en liberté à partir de l'huile d'olive par les *lipases sériques* des deux séries de souris.

TABLEAU N° 9

Série témoin

Temps en minutes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NaOH N/10 gouttes...	28	25	22	10	9	6	6	6	3	4	3	2
Total	28	53	75	85	94	100	106	112	115	119	122	124

TABLEAU N° 10

Série en expérience

Temps en minutes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NaOH N/10 gouttes ..	12	10	5	4	5	2	2	3	3	3	2	2
Total	12	22	27	31	36	38	40	43	46	49	51	53

Nous avons illustré ces valeurs par un graphique qui met en évidence l'action des antilipases apparues par la vaccination dans le sang des souris.

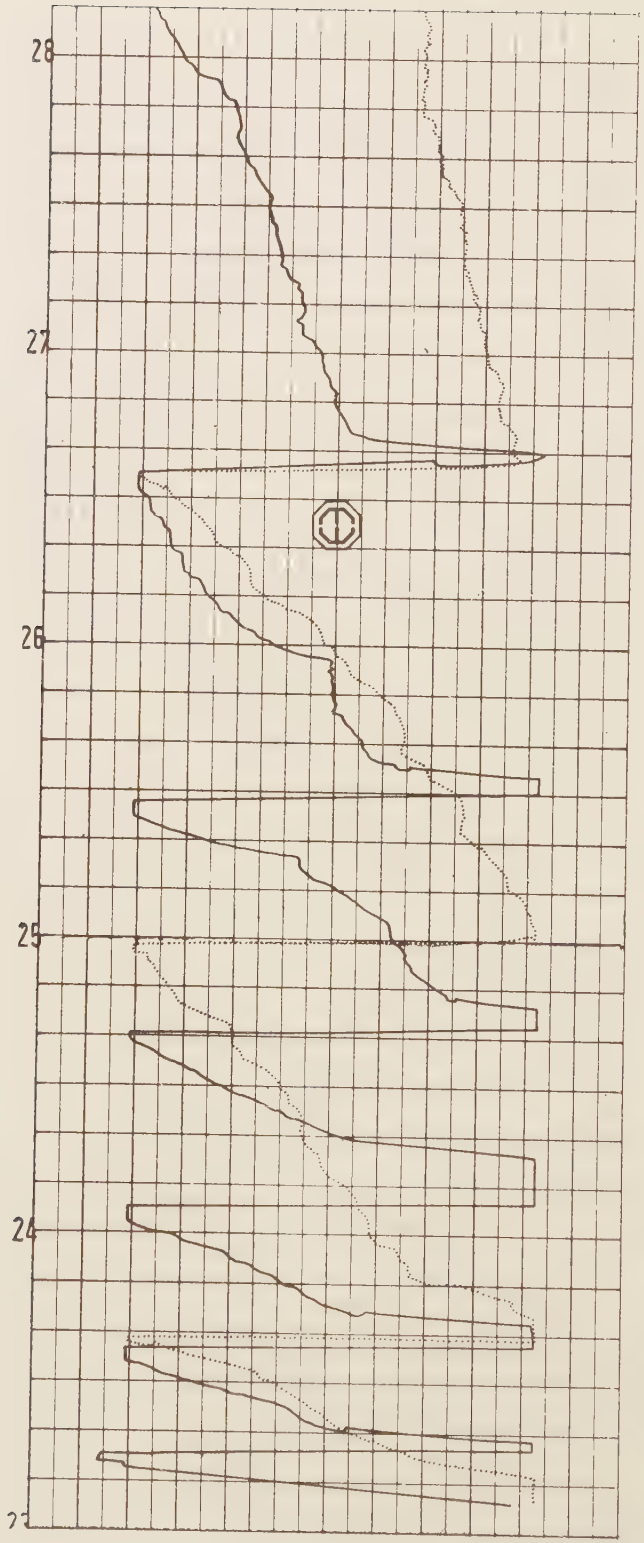


Fig. 19 et 20

Courbes démontrant le taux d'antilipases dans le sérum de souris vaccinées

Lipase dans le sérum normal : ————

Lipase dans le sérum vacciné : - - - - - - - -

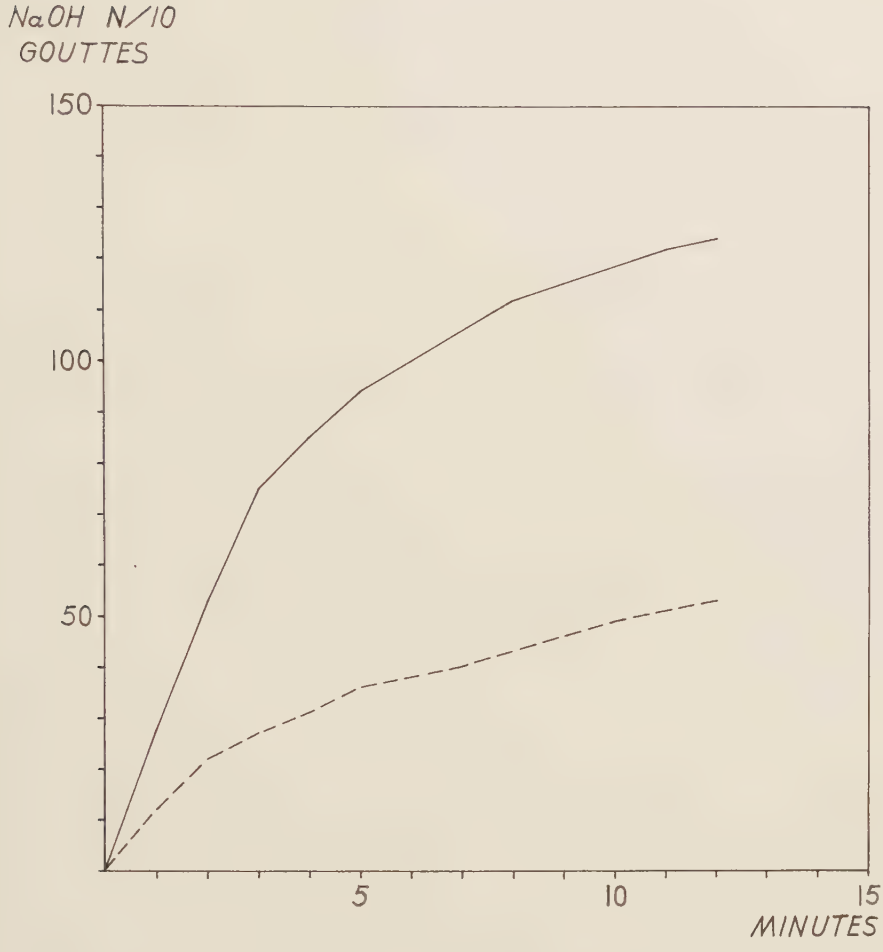


Fig. 21

Graphique évaluant l'action des antilipases dans le sang de souris vaccinées.

Cette expérience prouve que nos *lipases tuberculeuses purifiées ont un pouvoir antigénique faisant apparaître « in vivo » des anticorps spécifiques (antilipases)* qui, comme KRŒHNE l'a déjà démontré chez le lapin, entrent dans le groupe d'EHRLICH, agissant sur les antigènes d'excrétion et de sécrétion microbiennes sans intervention du complément.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

A la suite de notre partie historique, nous avons établi une *modification de la définition des tuberculolipases*, appuyée par des arguments nouveaux. Les définitions classiques sont trop limitées ou trop imprécises.

Nous avons essayé d'obtenir un aperçu plus profond de la *constitution* et des *propriétés physico-chimiques* du complexe estéraso-lipasique des bacilles tuberculeux.

Notre intérêt a été particulièrement attiré par le *rôle biologique* des lipases dans le métabolisme de ces bactéries. A ce sujet, nous avons essayé d'élucider l'influence de facteurs d'activation et d'inhibition sur les enzymes lipolytiques et nous avons pu constater l'existence de lipases à la fois dans les cellules bactériennes et dans l'hôte infecté. Nous avons relaté les conceptions actuelles sur l'importance des lipases chez les sujets malades. Pour mener à bien ces recherches, nous étions obligés de recourir à *des techniques de dosage des lipases* suffisamment sensibles. Nous passons donc en revue un certain nombre de ces méthodes.

Le problème essentiel de notre travail était l'*isolement et la purification de ces enzymes lipolytiques*. Nos travaux ont démontré l'importance du processus d'homogénéisation des cellules bactériennes, qui intervient essentiellement pour l'extraction des lipases des bacilles acido-alcoolo-résistants.

Nous avons pu définir les conditions optimales d'extraction des lipases en rapport avec les solvants, les températures, les valeurs de pH, les concentrations molaires et la durée d'extraction. On a ainsi pris connaissance des méthodes employées jusqu'à présent pour le fractionnement des extraits bruts, la concentration, la purification et la conservation de préparations d'enzymes lipolytiques.

Ainsi armé, nous avons pu élaborer le protocole expérimental de nos recherches. Nous avons principalement travaillé avec des *souches de Bacilles tuberculeux connues* (H 37 Ra, H 37 Rv et BCG). Nous tenons à faire remarquer, dès à présent, que nos résultats s'appliquent seulement à ces souches et ne peuvent pas être reportés aux *Bacilles de Koch* en général.

Pour le dosage des lipases, nous avons eu recours à la méthode potentiométrique de J. Meyer et ses collaborateurs. Comme substrats spécifiques, nous avons choisi l'huile d'olive, les Tweens 80, 60 et 20 ainsi

que le butyrate d'éthyle. Nous sommes conscient que d'autres substrats, tels que la tributyrine, le Tween 40, l'huile de tournesol, etc., pourraient également servir comme réactifs, puisque nous avons pu démontrer l'existence, *non pas d'une seule estérase ou lipase, mais d'un complexe lipolytique chez le Bacille tuberculeux.*

La production massive de cultures bactériennes en milieu liquide ne nous a posé aucun problème. Par ultrafiltration sur le filtre de Seitz, nous avons pu séparer, dans des cultures âgées de 10 à 15 jours, le milieu ambiant de la masse bactérienne. Dans le premier cas il ne nous a pas été donné de déceler d'activité lipasique proprement dite. Une *suspension de Bacilles tuberculeux non délipoïdés* a montré une activité lipolytique très prononcée sur le butyrate d'éthyle, qui diminuait progressivement, du Tween 60, au Tween 80 et à l'huile d'olive.

Le broyage *des Bacilles tuberculeux* à — 15° dans un broyeur électrique à billes de verre nous a permis de diminuer l'acido-résistance et de déceler ainsi des *lipases endocellulaires*. Pour éliminer les produits de ballast, nous avons traité nos masses bactériennes au moyen de solvants lipidiques à des températures très basses. Nous avons réussi à obtenir des *masses bactériennes complètement délipoïdées* par extraction au moyen d'acétone et de n-butanol, que nous avons séparées par centrifugation et décantation des solvants organiques employés pour l'extraction. Nous décrivons les méthodes qui nous ont permis de déceler dans ces quatre produits des *lipases liposolubles*.

Nous avons tenté de purifier les *lipases acétonosolubles* par dialyse et lyophilisation, mais ce procédé a détruit toute activité enzymatique.

Les *lipases solubles dans l'alcool butylique* ont conservé une certaine activité, même après la dialyse. Au cours de ces expériences, nous avons constaté qu'il fallait employer un temps de dialyse relativement bref et qu'il fallait dialyser contre une solution-tampon phosphatée plutôt que contre l'eau distillée. Il nous semble que les ions phosphatés exercent une influence protectrice sur les lipases liposolubles.

Les *masses bactériennes définitivement délipoïdées* selon notre technique gardaient une activité lipasique nette sur l'huile d'olive, les Tweens 80 et 60 et le butyrate d'éthyle.

Nous avons, d'autre part, pu déceler des *estérases oléophiles et glycérinophiles*, hydrolysant le butyrate d'éthyle. Par contre, nous n'avons pu mettre en évidence, dans nos conditions expérimentales, des *lipases oléophiles actives* en présence d'huile d'olive.

Nous avons pu extraire des bactéries délipoïdées, au moyen de soluté physiologique, des estérases et lipases fortement actives sur le butyrate d'éthyle et le Tween 60. Des dosages comparatifs de lipases extraites au moyen *d'eau bidistillée*, d'une part, et *de solution de chlorure de sodium*, d'autre part, nous ont permis de constater que la présence d'ions dans le milieu favorise l'extraction des lipases hydrophiles.

Nous avons étudié l'influence de solutions-tampon phosphatées de divers pH et concentrations molaires sur l'extraction optimale des lipases. L'extrait préparé avec le tampon phosphaté de pH = 6,8 et 0,2 mol. nous a fourni l'activité optimale sur l'huile d'olive. Cependant, des extraits lipasiques peuvent également être préparés au moyen de tampons phosphatés de 0,05 à 0,2 mol. et de pH = 6,8 à 7,4. Les estérases les plus actives contre le butyrate d'éthyle ont été obtenues au moyen du tampon phosphaté de 0,05 mol. et de pH = 7,2.

Notre technique de purification des lipases à l'aide de *précipitations fractionnées par l'éthanol*, suivies de dialyse et de lyophilisation, ne nous a pas donné de résultats satisfaisants. *La purification des tuberculolipases* a été réalisée avec succès par *la chromatographie en colonne.* Comme adsorbant, nous avons eu recours à la *cellulose* DEAE.

Après ces essais de purification, il nous a semblé nécessaire d'étudier *le rapport entre l'activité lipasique et le taux de protéines de nos extraits.* A ce sujet, nous avons procédé au dosage des protéines par *la méthode colorimétrique du Biuret* en employant comme protéine-standard l'albumine de bœuf, fraction V pure.

Nous avons obtenu une adsorption satisfaisante des protéines porteuses de lipases sur notre échangeur d'ions dans des substrats équilibrés au moyen de solution-tampon citraté phosphaté de pH = 6,9, de tampons phosphatés purs de pH = 6,8 et 6,9 et de tampon Sigma de pH = 7,9.

Les conditions optimales d'extraction et d'adsorption des protéines lipasiques sur la cellulose DEAE sont réalisées par la solution tampon phosphatée de pH = 6,8. Nous avons pu obtenir une élution quantitative des lipases adsorbées en modifiant légèrement les concentrations molaires et le pH de la solution adsorbante initiale.

Les lipases ainsi éluées ont été déshydratées, lyophilisées et nous avons contrôlé leur activité « *in vitro* » et « *in vivo* ». Pour ce dernier cas, nous avons essayé de mettre en évidence le *pouvoir antigénique* de ces lipases qui, par injection à des souris, ont fait apparaître, dans le sang de ces animaux, des *antilipases* que nous avons pu mettre en évidence par dosage en retour, en présence d'huile d'olive et en comparaison avec le sérum lipasique de souris-témoins traitées uniquement par des injections de solution isotonique de lactose.

Nous croyons ainsi avoir pu apporter une contribution utile à la connaissance des *lipases des bacilles acido-alcoolo-résistants* et de leur rôle dans le métabolisme des sujets infectés.

BIBLIOGRAPHIE

(58) Adinolfi G. et Scoz G. — Ann. Ist. Carlo Forlamini, 1948, 11, 173; dans Chem. Abstracts 1948, 42, 8925.

(83) Anderson R. J. — Yale Journ. Biol. Med., 1943, 15, 311.

(17) Archibald R. M. — Journ. Biol. Chem., 1946, 165, 443.

(120) Arnold E. — *Étude différentielle de deux lipases fongiques.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1960.

(78) Asselineau J. — Adv. Tuberc. Research, 1952, 5, 1.

(79) Asselineau J. — Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 1397.

(81) Asselineau J. et Lederer E. — Experientia, 1951, 7, 281.

(20) Bamann E. et Myrbäck K. — *Die Methoden der Fermentforschung*, Thieme Verlag, Leipzig, 1941, 1547.

(21) Bamann E., Ullmann E. et Tietz N. — Biochem. Zeit., 1953, 324, 134.

(108) Bevilacqua E. B. et Mc Carter J. R. — Journ. Exp. Med., 1948, 87, 229.

(44) Birath G. — Beitr. Klin. Tuberc., 1941, 96, 89.

(93) Bloch H. — Amer. Rev. Tubercul., 1950, 61, 270.

(64) Bloch R. J., Durrum E. L. et Zweig G. — *A Manual of paperelectrophoresis and paperchromatography.* Academic Press, Inc., New York, 1955.

(60) Boissonas R. A. — Helv. Chem. Acta, 1948, 31, 1571.

(116) Boman H. G. — Nature, 1955, 175, 898.

(80) Boquet A. et Negre L. — Ann. Inst. Pasteur, 1923, 37, 787.

(14) Bulder C. J. — Antonie van Leeuwenhoek Journ. Microbiol. and Serology Amsterdam, 1955, 21, 432.

(25) Burrow W. — *Textbook of Microbiology*, W. B. Saunders Comp., Philadelphia, 1959.

(4) Carrière G. — C.R. Soc. Biol., 1901, 53, 320.

(119) Christen H. U. — *Étude différentielle des estérases, des lipases liposolubles et des lipases hydrosolubles.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1959.

(29) Ciba Foundation. — *Symposion on Paper Electrophoresis*, Little, Brown and Co, Boston, 1956.

(30) Ciba Foundation. — *Symposion on the Regulation of Cell Metabolism*, Little, Brown and Co, Boston, 1958.

(8) Cohen S., Kushnick J., et Purdy C. — Journ. Bact. 1953, 66, 266.

(56) Colowick S. P. et Kaplan N. O. — *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, Vol. 1-IV, 1955-1957.

(59) Cowgill R. W. et Pardee A. B. — *Experiments in Biochemical Research Techniques*, Chapman and Hall, Ltd, New York, 1957.

(24) Crowle A. J. — Bacterial Reviews, 1958, Vol. 22, N° 3, sept., 183.

(118) Crowle A. J. — *Filtration of Mycobacteria from organic Solvents.* Am. Rev. Tuberc., 1958, Vol. 77, N° 2, 290.

(16) Davis B. D. et Dubos R. — Arch. Biochem., 15, 351.

(65) Mac Donald H. J. — *Ionography-electrophoresis in stabilized Media.* The Yaer Book Publ., Inc., Chicago, 1955.

(51) Dubos R. — Journ. Exp. Med., 1950, 92, 319.

(90) Dubos R., Middlebrook, Gardiner. — Am. Rev. Tuberc., 1947, 56, 334.

(26) Enemoto T. — Nisshin Igaku, 1952, 32, 6616 in Chem. Abstracts, 1954. 48. 7747c.

(32) Fabisch W. — Biochem. Zeit., 1933, 259, 420.

(41) Fernandes R., Cunha W. M. et Cullinger O. — Revista Brasileira de Tuberculose, 1956, 24, 166, 213.

(91) Fisher M. W., Kirchheimer W. F., Hess A. R. — Journ. Bact., 1951, 62, 319.

(84) Frouin A. — C.R. Soc. Biol. 1921, 84, 606.

(85) Frouin A. et Guillaumie M. — C.R. Soc. Biol., 1924, 90, 731.

(86) Frouin A. et Guillaumie M. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1926, 8, 1178.

(27) Gerstl B. et Tennant R. — Am. Rev. Tuberc., 1942, 46, 600.

(54) Gerstl B. et Tennant R. — Yale Journ. Biol. Med.. 1941, 14, 29.

(53) Gerstl B., Tennant R. et Plezman O. — Yale Journ. Biol. Med., 1945, 17, 455.

(70) Giri K. V. et Prasad A. L. — Nature, 1951, 167, 859.

(69) Giri K. V., Prasad A. L., Gowriy D. S. et Ram J. — Biochem. Journ. 1952, 51, 123.

(115) Gœtz K. — *Les Hyaluronidases chez les champignons inférieurs pathogènes.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1960.

(104) Goldman D. S. — Journ. Bact. 1956, 71, 732.

(18) Gomori G. — Sox. Exp. Biol. and Med., 1945, 58, 362.

(49) Hattori S., Oshima Y., Hagihara T., Nagata Y., Mishima J. — Kekkaku, 1955, 30, 12, 716.

(100) Heckley M. J. et Watson D. W. — Am. Rev. Tuberc., 1950, 61, 798.

(106) Heckley M. J. et Watson D. W. — Am. Rev. Tuberc., 1951, 64, 602.

(113) Hirs C. H., Stein W. H. et Moore S. — Journ. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1873.

(114) Hogberg B. — Acta Chem. Scandinav., 1954, 8, 1098.

(98) Hoshishima K. — Fukushima Journ. Med. Science, 1954, Vol. 1, N° 2, 179.

(28) Hoshishima K., Tanaka Y., Minoru H., Rikimaru M. — Fukushima Journ. med. Science, 1955, Vol. 2, 121.

(11) Huggins Ch. et Lapides J. — Journ. Biol. Chem., 1947, 170, 467.

(1) Jabobs M. — *Dictionary of Microbiology*, D. van Nostrand Co, Inc., Princeton, N.J., 1957.

(42) Kaplan J., Cohn D. J., Levinson A. et Stern B. S. — Journ. Lab. and Clin. Med., 1939, 24, 1150.

(43) Kaplan J., Cohn D. J., Levinson A. et Stern B. S. — Journ. Lab. and Clin. Med., 1940, 25, 495.

(5) Kendall A. I., Wallser A. W. et Day A. A. — Journ. Infect. Dis., 1914, 15, 443-451-455.

(52) Korth W. et Bock G. — Beitr. Klin. Tuberc. 1957, 116, 6, 479.

(36) Kraut H. et Burger H. — Zeitschr. physiol. Chem., 1938, 253, 105.

(73) Kroehne O. G. — *Les ferments lipolytiques des Mycobactéries.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1961.

(75) Lamanna G. et Mallette F. M. — *Basic Bacteriology. Its biological and chemical Background.* The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1955.

(67) Lederer M. — *An Introduction to Paperelectrophoresis and Reladet Methods.* Elsevier Publ. Co., New York, 1955.

(66) Lederer E. et Lederer M. — *Chromatography. A review of principles and applications.* Elsevier Publ. Co, New York, 1957.

(7) Long E. R. — *The chemistry ans chemotherapy of Tuberculosis.* The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1958.

(88) Long E. R., Anderson R. J., Rittenberg D. et Karnowsky M. L. — Am. Rev. Tubercul. 1955, 71, 609.

(82) Machebœuf M., Dieryck J. et Stoop R. — Ann. Inst. Pasteur, 1935, 54, 71.

(111) Marchis-Mouren G., Constantin M. J. et Desnuelle P. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 12, 2019.

(38) Marconi P. — Boll. Soc. ital. Biol. speriment., 1944, 19, 320.

(31) Martin G. J. — *Clinical Enzymology.* Little, Brown and Co, Boston, 1958.

(97) Maximox A. A. et Bloom W. — *A Textbook of Histology.* W. B. Saunders Co, Philadelphia, 1952, 414.

(39) Mello M. I., Queiroga L. T. et Marchesi P. — Revista Brasileira de Tuberculose, 1956, 24, 172, 1089.

(40) Mello M. I., Queiroga L. T. et Marchesi P. — Memorias de Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1956, 54, 2, 433.

(92) Meyer J. — *Les ferments lipolytiques du sérum sanguin et des bactéries acido-alcoolo-résistantes. Leur rôle dans le processus physio-pathologique.* Thèse Doct. Pharm. (État) Strasbourg, 1947.

(19) Meyer J. et Malgras J. — Bull. Acad. Méd. Paris, 1953, 137, 19-20.

(47) De Michele G. — Boll. Soc. ital. Biol. speriment., 1945, 20, 156. In chem. Abstracts, 1946, 40, 5829.

(101) Millman J. et Darter R. W. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1956, 91, 271.

(103) Millman J. et Youman G. — Journ. Bact., 1955, 69, 320.

(10) Nachlas, Marvin M., Seligman A. M. — Journ. Biol. Chem. 1949, 181, 343.

(76) Noller C. R. — *Chemistry of organic Compouds.* W. B. Saunders Co, Philadelphia, 1955.

(34) Patnode R. A. — Am. Rev. Tuberc., 1954, 69, 710.

(35) Prina C. — Arch. science med. Torino, 1953, 96, 284.

(45) Prina C. — Boll. dell'ist. sieroterapico, Milano, 1953, 32, 1-2, 40.

(46) Prina C. — Boll. dell'ist. sieroterapico, Milano, 1953, 32, 3-4, 124.

(112) Rasmussen S. P. — Biochem. et Biophys. Acta, 1955, 16, 157.

(12) Ravin H. A. et Seligman A. A. — Arch. Biochem., N. Y., 1953, 42, 337.

(71) Richou R. — C.R. Ac. Sciences, 1959, 249, 2131.

(72) Richou R., Richou H., Quinchon et Pantaleon. — Revue d'Immunologie, 1960, 24, 496.

(9) Richter D. et Croft P. G. — Biochem., Journ., 1942, 36, 746.

(63) Rohdewald M. — Enzymologia, 1958, 19, 1, 16.

(94) Rosenberg A. J. et Andrejew A. — C.R. Soc. Biol. 1952, 235, 1437.

(95) Rothstein A. et Meyer R. — Journ. Cellular and comp. Physiol., 1948, 32,77.

(105) Roulette et Zeller E. A. — Helv. Chem. Acta, 1948, 31, 1915.

(23) Sartory A. et Meyer J. — Bull. Acad. Méd. Paris, 1947, 131, 243.

(55) Sartory A. et Meyer J. — Bull. Soc. Chim. Biol. 1947, 29, 863.

(22) Sartory A., Meyer J. et Lange J. M. — Bull. Acad. Méd. Paris, 1947, janvier, 7.

(37) Scoz G. et Guzzi L. — Klin. Woschenschr., 1940, 19, 1014.

(109) Seibert F. — Am. Rev. Tuberc., 1949, 59, 86.

(13) Sierra G. - Antonie van Leeuwenhoeck Journ. Microbiol. and Serology. Amsterdam, 1957, 23, 1, 15.

(15) Skerman V. B. — *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria.* The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1958.

(96) Smith B., Blamer P. R., Vellios F. et Schulz D. M. — *Principles of Human Pathology.* Oxford University Press, 1959, 19, 341.

(110) Sober H. A. et Peterson E. A. — Journ. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 1711.

(68) Stanly P. G., Ramsay D. S. — Journ. Lab. and Clin. Med. St-Louis, 1956, 48, 3, 649.

(50) Stoll L. — *Zur Bedeutung der Lipase bei der Tuberkulose.* Beitr. Klin. Tuberc., 1959, 119, 5, 439.

(74) Sumner J. B. et Myrbäck K. — *The Enzymes.* Academic. Press, New York, Vol. 1-IV, 1950.

(33) Swell L. et Treadwell L. R. — Journ. Biol. Chem., 1950, 182, 479.

(107) Tanaka Y., Tanno R. et Hoshishima K. — Fukushisa Journ. Med., Science, 1955, Vol., 2, 1.

(57) Tauber H. — Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., 1955, 90, 2, 375.

(87) Terroine E. F. et Lobstein J. E. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1923, 5, 183.

(2) Thomas S. et Grainger Th. — *Bacteria.* The Blakiston Company, New York, 1952.

(77) Transactions *of the* 18*th Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis*, 1959, St-Louis, Missouri.

Veterans Administration Department of Medecine and Surgery Central Office, Washington, 25, D.C., USA.

(117) Villiger P. — Biochemistry Research Building of the U.S. Army Veterans Administration Hospital, Denver, Colorado, USA.

(102) Volk W. A., Myrwick Q. N. — Am. Rev. Tuberc., 1956, 73, 789.

(6) Wells H. G. et Corper H. J. — Journ. Infect. Dis., 1918, 11, 388.

(89) Yamane I., Kazumori M., Yasui T. — Fukushima Journ. Med. Science, 1954, vol. 1, 105.

(48) Yasuda R. — Tohoku Journ. Exp. Med., 1933, 20, 265, in Chem. Abstracts, 1933, 27, 2202.

(99) Youman A. S., Millman J. et Youman G. — Journ. Bact., 1956, 71, 565.

(61) Zechmeister L. et Rohdewald M. — Enzymologia, 1949, 13, 388.

(62) Zechmeister L. et Rohdewald M. — Enzymologia, 1951, 15, 109.

(3) Zinsser. — *Zinssers Bacteriology.* Appleton-Century-Crofts Inc., New York, 1957.

Vu, Strasbourg, le 23 octobre 1961

Le Président du Jury,

R. SARTORY

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 27 octobre 1961

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

Pour le Doyen :

L'Assesseur

GAZET DU CHATELIER

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 7 novembre 1961

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

J. F. ANGELLOZ

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

PLAN DE TRAVAIL 7

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

Bases théoriques de l'étude des lipases 9

Définition des tuberculolipases 9

CHAPITRE II

Origine, constitution et rôle biologique des lipases 15

Rôle des lipases chez le sujet tuberculeux 16

Mise en évidence des lipases 17

Constitution et propriétés physico-chimiques des lipases 18

Définition et structure moléculaire des enzymes 18

Propriétés physico-chimiques des enzymes 19

Mécanisme d'action des enzymes 20

Rôle biologique des lipases dans le métabolisme des bacilles tuberculeux 20

Genèse et activation des tuberculolipases 22

CHAPITRE III

Isolement et purification des tuberculolipases 25

Homogénéisation de la culture microbienne 25

Dénaturation sélective des protéines 27

Adsorption sélective 28

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE IV

Etude du pouvoir lipolytique des cultures de bacille de Koch 31

Culture des Bacilles de Koch 31

Méthode de dosage des lipases 32

Les substrats lipidiques spécifiques 33

Principe du dosage de l'activité lipasique 34

Recherche de l'activité lipasique dans le filtrat de culture 34

Recherche de l'activité lipasique dans le résidu déshydraté et délipoïdé.. 34

Recherche de l'activité lipasique dans les surnageants..... 40

CHAPITRE V

Nouvelles recherches de l'activité lipasique dans les résidus bactériens délipoïdés.. 43

Essai d'isolement et de purification des lipases 47

Dosage des lipases dans le surnageant et le résidu alcooliques 48

Dosage des protéines 48

CHAPITRE VI

Essai de purification des lipases par chromatographie 53

Recherche du pouvoir lipasique des solutions de protéines 54

Essai d'isolement par chromatographie des lipases adsorbées..... 55

CHAPITRE VII

Formation d'antilipases par injection de nos lipases purifiées..... 61

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 67

BIBLIOGRAPHIE 71

Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg — Dépôt légal N° 1120/61